

Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß von Interleukin 13 auf
Neutrophile Granulozyten unter inflammatorischen Bedingungen.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Gunnar M. Pabst
aus Limburg a. d. Lahn

Gießen 2004

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik II

Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

des Universitätsklinikums Gießen

Betreuer: Dr. K. Mayer

Gutachter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: PD Dr. T. Menges

Tag der Disputation: 04. Juli 2005

I. Einleitung	1
1. VORWORT	1
2. SEPSIS UND ARDS: BEDEUTUNG VON PMN UND MEDIATORSYSTEMEN	2
2.1. SEPSIS	2
2.2. AKUTES RESPIRATORISCHES DISTRESS-SYNDROM (ARDS)	8
3. INFLAMMATION UND IMMUNANTWORT – ROLLE POLYMORPHKERNIGER NEUTROPHILER LEUKOZYTEN	11
3.1. ÜBERSICHT: FUNKTION UND STEUERUNG GRANULOZYTÄRER MECHANISMEN	11
3.2. DEGRANULATION	12
3.3. NADPH OXIDASE SYSTEM	15
3.4. “PRIMING“ VON GRANULOZYTEN UND SIGNALTRANSDUKTION	18
3.4.1. Lipopolysaccharid priming	18
3.4.2. Signaltransduktionsweg zur Aktivierung der NADPH Oxidase	19
4. REGULATIONSMECHANISMEN GRANULOZYTÄRER FUNKTIONEN	21
4.1. ZYTOKINE	21
4.1.1. Interleukin-13 (IL-13)	21
4.2. LIPIDMEDIATOREN	22
4.2.1. Eicosanoide	23
4.2.2. Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)	26
5. FRAGESTELLUNG	29
II. Material und Methodik	30
1. MATERIAL	30
1.1. PHARMAKA UND AGENZIEN	30
1.2. INKUBATIONSMEDIEN UND ZELLKULTURMATERIAL	31
1.3. HPLC-MATERIALIEN UND ANDERE LÖSUNGSMITTEL	32

1.4. AUTHENTISCHE STANDARDS	33
1.5. LÖSUNGEN FÜR DIE ELASTASEMESSUNG	33
1.6. AGENZIEN UND LÖSUNGEN FÜR DEN PAF-BIOASSAY	34
1.7. GERÄTE	34
2. METHODIK	36
2.1. ISOLIERUNG HUMANER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN	36
2.2. STANDARDPROTOKOLL DER GRANULOZYTENVERSUCHE	37
2.3. ANALYTIK GRANULOZYTÄRER FUNKTIONSEINHEITEN	38
2.3.1. Degranulation	38
2.3.2. Respiratorischer Burst	39
2.4. ANALYTIK DER ARACHIDONSÄURE-METABOLITE	40
2.4.1. Festphasenextraktion	40
2.4.2. HPLC-Analyseverfahren	41
2.5. ANALYTIK DES PLÄTTCHEN-AKTIVIERENDEN FAKTORS	43
2.5.1. Lipidextraktion	43
2.5.2. PAF-Bioassay	43
2.5.3. Statistik	45
III. Ergebnisse	46

1. INTERLEUKIN 13 STEIGERT TENDENZIELL DIE LPS-AUSGELÖSTE BILDUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES IN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	46
2. INTERLEUKIN 13 FÜHRT ZUR VERMEHRTEN AKTIVIERUNG VON PROTEINKINASE C (PKC)	51
3. HEMMUNG DER LPS GETRIGGERTEN DEGRANULATIONSREAKTION VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN DURCH INTERLEUKIN 13	54
4. EINFLUß VON INTERLEUKIN 13 AUF DEN 5-LIPOXYGENASE-METABOLISMUS	56
5. EINFLUß VON INTERLEUKIN 13 AUF DEN PAF METABOLISMUS	60

<u>IV. Diskussion</u>	<u>62</u>
1. INTERLEUKIN 13 VERSTÄRKT DEN LPS GEPRIMTEN RESPIRATORISCHEN BURST	62
2. INTERLEUKIN 13 FÜHRT ÜBER EINE VERMEHRTE AKTIVIERUNG DER PROTEINKINASE C ZU EINER STEIGERUNG DER SUPEROXIDPRODUKTION	64
3. INTERLEUKIN 13 FÜHRT ZUR HEMMUNG DER LPS GETRIGGERTEN DEGRANULATIONSREAKTION	65
4. UNTER INFLAMMATORISCHEN BEDINGUNGEN HEMMT INTERLEUKIN 13 DEN 5-LIPOXYGENASE-METABOLISMUS	66
5. UNTER INFLAMMATORISCHEN BEDINGUNGEN KOMMT ES ZUR STEIGERUNG DER PAF BIOSYNTHESE, DIE SICH DURCH IL-13 NICHT BEEINFLUSSEN LÄBT	68
<u>V. Zusammenfassung</u>	<u>70</u>
<u>VI. Summary</u>	<u>72</u>
<u>VII. Literaturverzeichnis</u>	<u>74</u>
<u>VIII. Anhang</u>	<u>86</u>
1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	86
2. LEBENSLAUF	89
3. DANKSAGUNG	91

4. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

92

I. Einleitung

1. Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in dem Zeitraum von November 1996 bis Januar 1999 am Zentrum für Innere Medizin im Laborbereich von Herrn Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger in der klinischen Forschungsgruppe „Respiratorische Insuffizienz“ und im Rahmen des SFB 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Werner Seeger unter der Betreuung von Herrn Dr. Konstantin Mayer. Die experimentellen Untersuchungen umfaßten den Einfluß von Interleukin 13 auf Neutrophile Granulozyten unter inflammatorischen Bedingungen.

2. Sepsis und ARDS: Bedeutung von PMN und Mediatorsystemen

Eine Reihe von ernsthaften Erkrankungen oder Verletzungen wie Sepsis, Polytrauma, Verbrennungen oder Pankreatitis lösen ein generalisiertes Entzündungsgeschehen im Körper aus, welches als "systemic inflammatory response syndrome (SIRS)" bezeichnet wird. Dieses Syndrom schließt ein multiples Organversagen ein, welches die Bezeichnung "Multiple Organ Failure (MOF)" trägt (Bone et al., 1992). Ein weiteres Syndrom, das "Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)", ist eine Hauptkomponente des MOF. Durch das verbesserte Verständnis für die Pathophysiologie des SIRS und MOF hat man die Schlüsselrolle der Neutrophilen Granulozyten (PMN) an den Gewebeerletzungen und den daraus resultierenden Organdysfunktionen erkannt. Eine ganze Reihe von Mediatoren sind an der von den PMN hervorgerufenen Zellschädigung beteiligt. Man weiß inzwischen, daß PMN nicht einfach nur Effektorzellen des Immunsystems sind, sondern daß sie durch ihre Fähigkeit der Zytokinproduktion in die Immunregulation eingreifen und dadurch direkt mit anderen Entzündungszellen kommunizieren (Fujishima & Aikawa, 1995).

2.1. Sepsis

Pathophysiologische Grundlagen

Der septische Schock beginnt meist mit einer initialen Phase, die sich als hyperdynamische Form darstellt. In dieser Phase ist der Blutdruck des Patienten häufig normal, das Herzzeitvolumen sowie der zentrale Venendruck sind erhöht. Die Haut stellt sich trocken, warm und rosig dar. Durch organ- und kreislaufunterstützende Maßnahmen wird diese Phase häufig überstanden und es entwickelt sich ein protrahiert verlaufendes Krankheitsbild mit schubweisem Verlauf oder einer chronisch kontinuierlichen Verschlechterung, welche über Tage oder Wochen bis hin zum Multiorganversagen verlaufen kann. Diese Phase bezeichnet man als „chronisches Sepsissyndrom“. In diesem Stadium ist ein definitiver Keimnachweis meist nicht mehr möglich, und trotz massiver antimikrobieller Maßnahmen, Optimierung der Makro- und Mikrozirkulation, Ausgleich des Säure-Base- und Flüssigkeits-Haushaltes ist die Progredienz oft nicht aufzuhalten. Vor diesem Hintergrund wurde eine Toxin- bzw. Zytokinhypothese der Sepsispathogenese aufgestellt, bei der davon ausgegangen wird, daß längst nicht mehr die Mikrobe sondern sekundäre Faktoren den Verlauf bestimmen (Griminger et al., 1997). Am Anfang dieses Denkmodells steht die Einschwemmung von Bakterien oder von bakteriellen

Toxinmolekülen aus einem Infektionsherd in die systemische Zirkulation. Ein bakterielles Toxin, das **Endotoxin** (LPS), welches eine Lipopolysaccharid-Komponente der Wände gramnegativer Bakterien ist, ist in seiner Wirkung sehr gut charakterisiert (Brigham & Meyrick, 1986) und hat eine besondere Bedeutung erlangt u.a. in der Aktivierung immunologischer Zielzellen wie z.B. den Granulozyten. Insbesondere durch die Freisetzung entzündungsfördernder Komponenten (Zytokine, Lipidmediatoren) wird sekundär eine diffuse Schädigung der Mikrozirkulation ausgelöst. Aber auch **Peptidoglykane** (Syn. Mureinschicht) aus der Zellwand grampositiver Bakterienspezies und **Exotoxine** verschiedener grampositiver und gramnegativer Keime (*Escherichia coli*, *Staphylokokkus aureus*, β -hämolyisierende Streptokokken) (Bhakdi et al., 1996) können zur Aktivierung leukozytärer Zellpopulationen führen. Ein weiterer Mechanismus, der kürzlich beschrieben worden ist, ist das Sezernieren von **Superantigenen** aus *Staphylokokken*, welche das Kontrollsystem der Lymphozytenaktivierung kurzschließen, indem sie die HLA-Klasse II-Moleküle der antigenpräsentierenden Monozyten mit den Antigenrezeptoren der T-Lymphozyten überbrücken. Dadurch werden bis zu 25% aller T-Lymphozyten gleichzeitig aktiviert, was zu einer Überschwemmung der Zirkulation mit immunregulatorischen Zytokinen führt. Diese Hyperaktivierung der immunologischen Effektorsysteme durch bakterielle Toxine führt zu einer übersteuerten Auslösung von Sekundärreaktionen, die wiederum zur überschießenden Aktivierung vasoregulatorischer Mediatorsysteme (Gerinnung, Komplement, Lipidmediatoren, Kinin, Sauerstoffradikale) führen. Dies hat eine inadäquate Gewebeperfusion und diffuse inflammatorische Prozesse in zahlreichen Organen zur Folge. Dieser Abschnitt der Sepsis wird als die Phase der **Hyperinflammation** beschrieben. Im weiteren Verlauf kommt es dann zur Erschöpfung der funktionellen immunologischen Reserven mit Eintritt in die Phase der **Immunparalyse**, in welcher die immunologische Resistenz für Sekundärinfektionen dramatisch abgenommen hat. Nachfolgend ist die Sepsispathogenese noch einmal grob vereinfacht in ihren Ebenen (Keim- bzw. Toxineinschwemmung – Aktivierung der Zielzellen – Zytokineinschwemmung – Aktivierung sekundärer Mediatorsysteme / Mikrozirkulationsstörung / Zellschädigung) schematisch dargestellt. (Abb. 1)

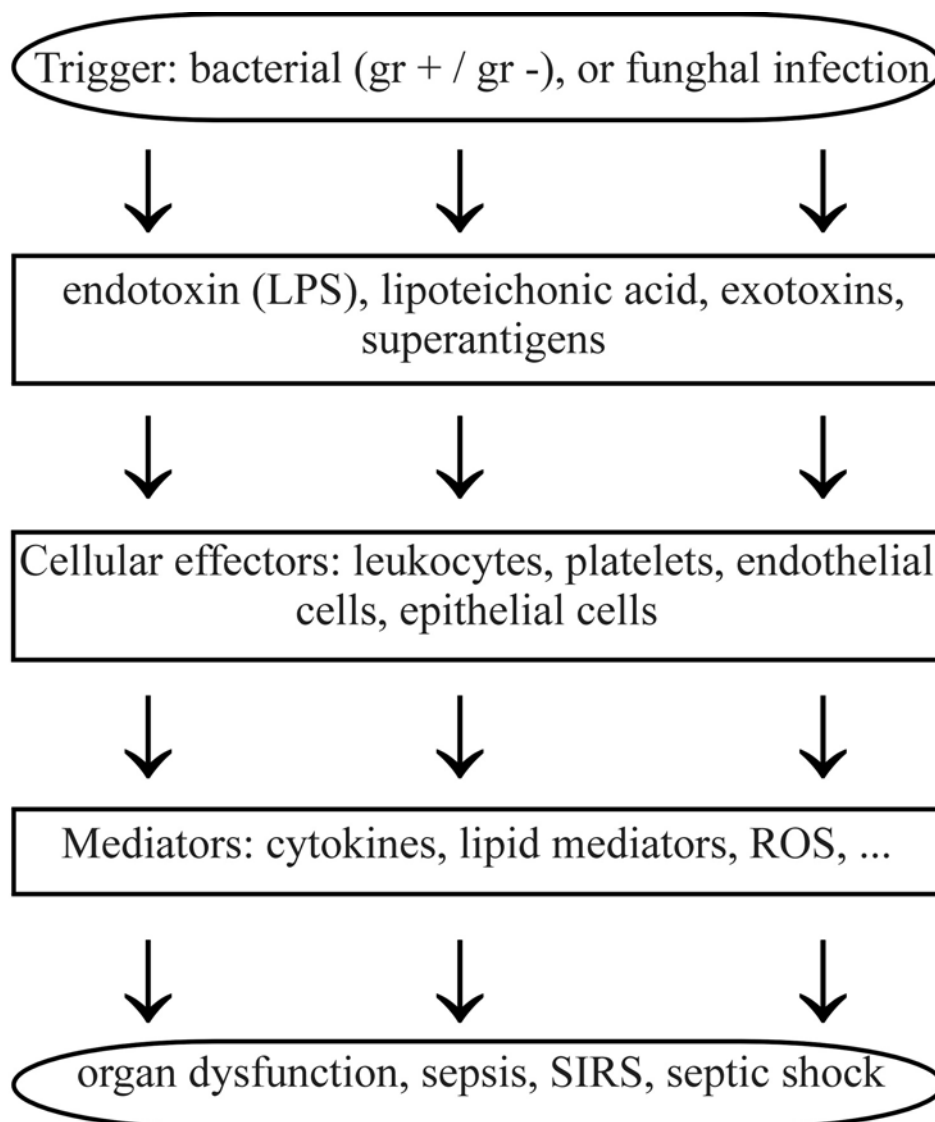


Abbildung 1

Schematische Darstellung der Ebenen in der Zytokinhypothese der Sepsispathogenese. Am Anfang dieses Denkmodells steht die Einschwemmung von Bakterien oder von bakteriellen Toxinmolekülen aus einem Infektionsherd in die systemische Zirkulation. Dadurch kommt es zur Aktivierung immunologischer Zielzellen und damit zur Freisetzung von entzündungsfördernden Mediatoren. Eine überschießende Aktivierung dieser Mediatorsysteme hat eine inadäquate Gewebepfusion und diffuse inflammatorische Prozesse in zahlreichen Organen zur Folge. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), gram positiv/negativ (gr+/-), Reactive Oxygen Species (ROS).

Zytokine in der Sepsis

Zytokine werden von einer ganzen Reihe von Zellen wie z.B. den Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten synthetisiert und in ihre Umgebung sezerniert. Dort entfalten sie ihr sowohl para- als auch autokrines Wirkspektrum, welches der Zelle zur Zell-Kommunikation bei immunologischen und inflammatorischen Prozessen und zur der Steuerung der Proliferation und Differenzierung von Leukozyten dient, um nur einige der Aufgaben zu nennen. Bei den Zytokinen handelt es sich um eine Gruppe von Polypeptidhormonen, die in ihrer Unterschiedlichkeit verschiedene und zum Teil auch gegensinnige Effekte in den Zielzellen auslösen. Sie sind Teil eines Netzwerkes, auf dessen einen Seite die immunstimulierenden Zytokine (Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α), Interleukin 1 (IL-1) etc.) stehen, und auf der anderen Seite die immunsupprimierenden Zytokine (IL-10, IL-13 etc.), über die bisher aber nur ein bruchstückhaftes Wissen vorliegt. In der folgenden Grafik sind die verschiedenen Zytokine und ihre Einordnung in Immun-Stimulation und -Suppression noch einmal bildlich dargestellt.

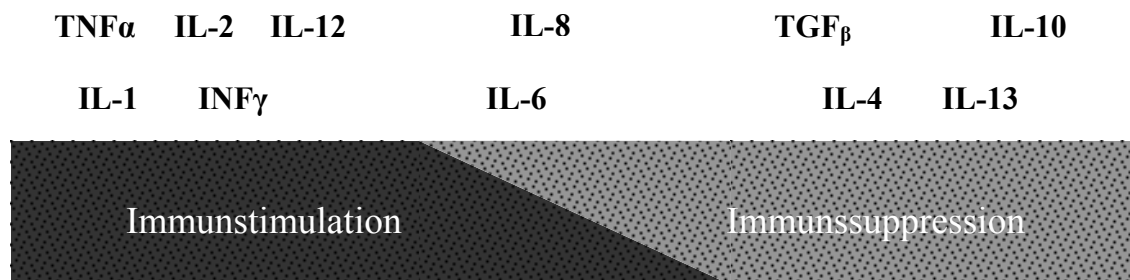


Abbildung 2

Zytokine sind Polypeptidhormone, die unterschiedliche Reaktionen in ihren Zielzellen auslösen können. Sie sind Teil eines Netzwerkes, auf dessen einen Seite die immunstimulierenden Zytokine und auf dessen anderen Seite die immunsupprimierenden Zytokine stehen. (TNF, Tumor Nekrose Faktor, IL, Interleukin, INF, Interferon, TGF, Transforming Growth Factor)

Nach dem derzeitigen Wissensstand besteht die physiologische Reaktion auf ein Infektionsereignis zunächst in der Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen. Im weiteren Verlauf der Abwehrreaktion sorgen Rückkopplungsmechanismen für die Umschaltung des Zytokinprofils hin zu den anti-inflammatorischen Zytokinen, was zu einer quantitativen, örtlichen und zeitlichen Begrenzung der Entzündungsreaktion führt und somit regenerative Prozesse zulässt. Diese Veränderung der Zytokinprofile lässt sich anhand des Plasmaspiegels verfolgen. Mit der Induktion zur Sepsis werden pro-inflammatorische Zytokine durch die zuvor beschriebenen Mechanismen über das physiologische Maß hinaus ausgeschüttet, wodurch es zu einer hyper-inflammatorischen Frühphase kommt. Bei der sich anschließenden kompensatorischen Rückkopplungsreaktion kommt es ebenfalls zu einer Übersteuerung der Zytokinausschüttung, diesmal jedoch im Sinne einer hypo-inflammatorischen Spätphase. Hypothetisch erlaubt diese Kenntnis der sich verändernden Plasmazytokinspiegel die Einteilung der Sepsis in 2 Phasen. In der ersten Phase überwiegen die pro-inflammatorischen Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-1, die in der zweiten Phase von Zytokinen wie u.a. dem IL-10 und IL-13 abgelöst werden. Die Erkenntnisse, denen die 2-Phasen-Hypothese der Sepsis zugrunde liegt, wurden größtenteils an Tiermodellen gewonnen. Die folgende Grafik zeigt diesen hypothetischen Zeitverlauf der Immunreaktion in der Sepsis. (Abb.3)

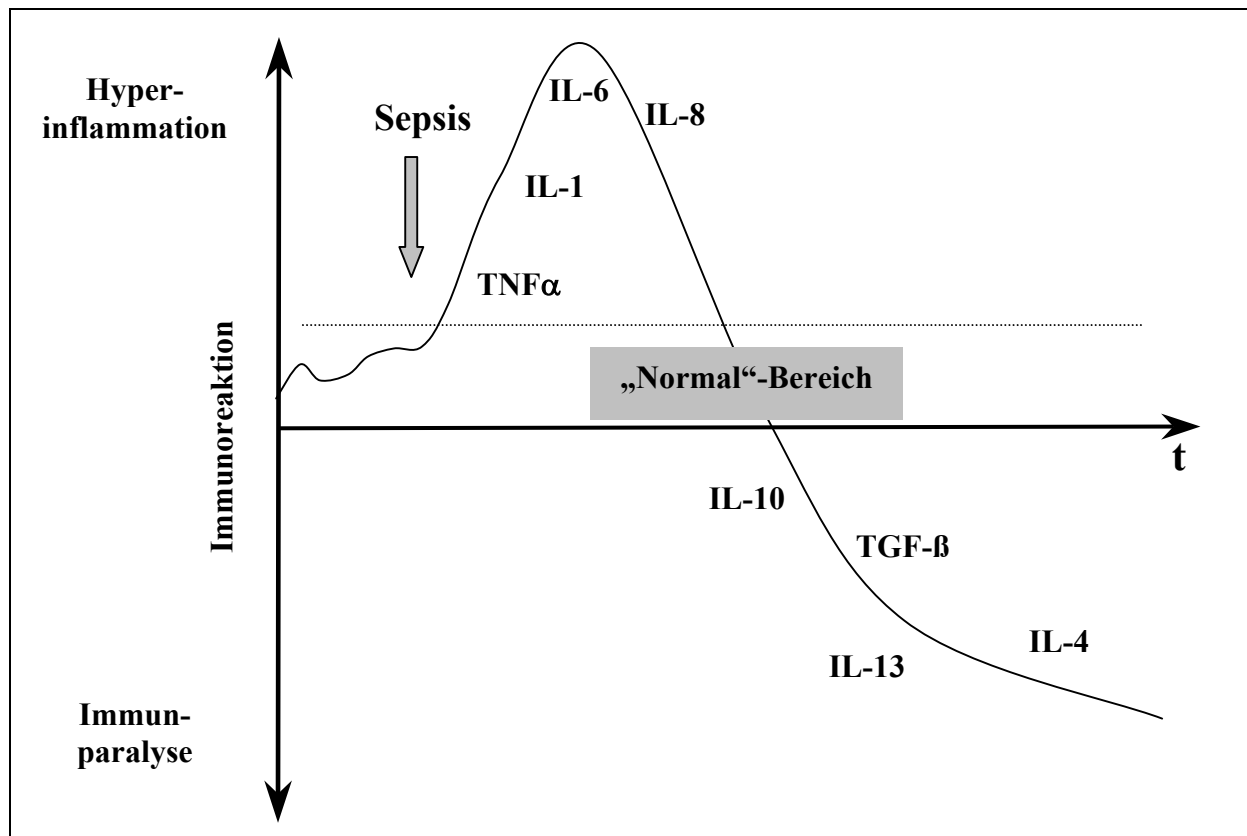


Abbildung 3

Hypothetisch lässt sich der Zeitverlauf der Immunreaktion in der Sepsis in eine hyper-inflammatorische Frühphase und in eine hypo-inflammatorische Spätphase gliedern. In der ersten Phase überwiegen die pro-inflammatorischen Zytokine wie TNF α und IL-1, die in der zweiten Phase von Zytokinen wie u.a. dem IL-10 und IL-13 abgelöst werden.

Therapie

Aufgrund der oben beschriebenen Sepsispathogenese ist die Therapie der Sepsis auf 3 Ebenen denkbar (Keim- u. Toxin-Einschwemmung - Aktivierung körpereigener Mediatorsysteme - symptomatische Maßnahmen auf Kreislauf- und Organebene). Die konventionelle Sepsistherapie konzentriert sich in erster Linie auf die Sanierung des Infektionsherdes und die antibiotische Eradikation der toxinproduzierenden Mikroben. Der Anteil der konventionellen Therapie, der sich auf die Symptome konzentriert, umfasst im wesentlichen die Optimierung der Makro- und Mikrozirkulationsverhältnisse, die Stabilisierung des Säure-Basen- und Flüssigkeit-Haushaltes sowie Maßnahmen zur Überbrückung der ausgefallenen Organfunktionen. Darüber hinausführende Ansätze zielen auf Toxinneutralisation mittels Immunglobulinen (z.B. selektiv gegen das Lipid A des Endotoxins) (Ziegler et al., 1982; Ziegler et al., 1991), Toxin- und Mediator-Entfernung mittels Hämo-perfusion oder

Hämofiltration (Aoki et al., 1994; Schetz et al., 1995), Antikörpertherapie gegen Zytokine TNF α (Fisher et al., 1993; Dhainhaut et al., 1995; Abraham et al., 1995), IL-1 (Lefering & Neugebauer, 1995) und die Suppression pro-inflammatorischer Zytokine mittels Glukokortikoiden. Klinische Studien in diesen Bereichen haben bisher nur positive Teilaspekte gezeigt. Insgesamt überzeugen die klinischen Therapieergebnisse bisher noch nicht.

2.2. Akutes Respiratorisches Distress-Syndrom (ARDS)

Das ARDS ist ein pathophysiologisch komplexes Geschehen, das mit Veränderungen der pulmonalen Vasomotion, Veränderung des alveolären Surfactantsystems und Störungen der endothelialen Permeabilität einhergeht. Es gibt eine Vielzahl von Synonymen des ARDS, unter anderem wird es als „Septische Lunge“ oder als „Posttraumatische Pulmonale Insuffizienz“ bezeichnet. Dies macht deutlich, daß es aus unterschiedlichen Ätiologien heraus entstehen kann. Im Rahmen einer Sepsis oder eines Polytraumas kann es neben anderen Organversagen (akutes Nierenversagen, akutes Leberversagen) als Teilkomponente zum Multiple Organ Failure (MOF) gehören (Petty, 1982). Liegt das ARDS als eine Teilkomponente des MOF vor, so muß mit einer steigenden Letalität gerechnet werden (Bone et al., 1989; Rinaldo & Rogers, 1986).

Pathogenese

Ein ARDS kann primär über den Intravasalraum oder primär über den Alveolarraum ausgelöst werden. Ein transbroncheal ausgelöstes ARDS wird überwiegend durch inhalierte Agenzien (z.B. Rauchgase), aspirierte Materialien und lokal liberierte mikrobielle Agenzien im Rahmen einer Pneumonie verursacht. Durch die erwähnten Stoffe kommt es zu einer Störung der Gasaustauschstrecke, welche in ihrer Morphologie aus Epithelschranke, Interstitium und Endothelschranke besteht. Die primär durch die Effektoren herbeigeführte Gasaustauschstörung wird sekundär durch eine fortdauernde Inflammation des Lungenparenchyms selbst unterhalten. In grober Vereinfachung lassen sich die entzündlichen Abläufe in eine **exsudative Frühphase** und eine **proliferativ-fibrosierende Spätphase** kategorisieren. Unter den Auslösern eines systemischen Geschehens kommt der Sepsis eine besondere Bedeutung zu. Hierbei spielt das Lipid A des Endotoxins im „klassischen Konzept“ zur Pathogenese des ARDS eine zentrale Rolle. Endotoxine aktivieren auf dem alternativen Weg die Komplementkaskade, was zur Freisetzung des chemotaktischen Faktors C5a führt.

Der Faktor C5a wiederum aktiviert zirkulierende Granulozyten und veranlaßt sie zum Sticking in der pulmonalen Mikrozirkulation mit anschließender lokaler Freisetzung ihrer Inhaltsstoffe (Proteasen, Sauerstoffradikale, Leukotriene), welche eine Permeabilitätserhöhung mit resultierender pulmonaler Ödembildung induzieren. Die genannten granulozytären Inhaltsstoffe sind allesamt potente Effektoren einer pulmonalen Mikrozirkulationsschädigung. Ebenso führt eine Komplementaktivierung zur Bildung des terminalen C5b-9-Komplexes. Dieser membranattackierende Komplex dringt in die Zellmembran ein und bildet so funktionelle Poren, durch die Natrium und Wasser in die Zelle bis zu ihrer Zerstörung einfließen (=Zytolyse).

Ein neueres ebenfalls an Endotoxin geknüpft Konzept stellt die Induktion der Zytokin-Generierung (insbesondere TNF α) durch ortständige Makrophagen ins Zentrum des pathologischen Geschehens. Durch die Einwirkung von Endotoxin auf die Makrophagen kommt es nach einer kurzen Zeit zur Ausschüttung größerer Mengen an TNF α , welches seinerseits wiederum zur Aktivierung der Granulozyten mit nachfolgender Permeabilitätserhöhung und proteinreicher Ödembildung in zahlreichen Mikrozirkulationsgebieten führt. Außerdem besitzt TNF α vasokonstriktorische Eigenschaften auf die pulmonalen Mikrozirkulationsgebiete, die zum größten Teil jedoch sekundär über eine lokale Eicosanoid-Bildung vermittelt werden.

Eine weitere Rolle spielen die schon oben erwähnten bakteriellen Exotoxine, welche das komplette Spektrum des ARDS in experimentellen Tiermodellen auslösen können. In höheren Dosen wirken sie über eine Porenbildung zelltoxisch, wohingegen sie schon bereits in niedrigen Dosen zur Aktivierung von inflammatorischen Zellen (Granulozyten, Makrophagen, Thrombozyten) führen (Walmrath et al., 1995).

Im Rahmen eines septischen Schocks kann es zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade kommen, welche durch den Untergang der Kapillarendothelien der terminalen Strombahn, und ihre dadurch entstandene Unfähigkeit, das Thrombozyten aggregationshemmende Prostazyklin zu bilden, verursacht wird. Es überwiegt die Ausschüttung des Thrombozytenprostaglandins (Thromboxan), welches aus der gleichen Prostaglandinvorstufe wie das Prostazyklin gebildet wird, so daß es zur Thrombozyten-Aggregation und dadurch zur Thrombin Aktivierung kommt (Riede & Schaefer, 1995). Diese disseminierte intravasale Gerinnung kann über eine Mikroembolisation der pulmonalen Strombahnen mit partikulärem Gerinnungsmaterial oder über die Einwirkung von löslichen Fibrinmonomeren bzw. Fibrinoligomeren auf die pulmonalen Strombahnen die initiale Veränderung eines ARDS verursachen.

Die fortdauernde Entzündung des Lungenparenchyms ruft die für das ARDS typischen Symptome hervor. Diese äußern sich als interstitielle und alveoläre Ödembildung bei endoepithelialer Permeabilitätsstörung; Störung der alveolären Surfactantfunktion mit Konsequenzen für die Alveolenstabilität (Atelektasen), den Gasaustausch (Ventilationsfehlverteilung / Shunt-Fluß) und für die Lungenmechanik (Abnahme der pulmonalen Compliance); pulmonalvaskuläre Widerstandserhöhung (durch Vasokonstriktion / Mikroembolisation / Mikrothrombosierung) mit konsekutiver akuter Rechtsherzbelastung. Am Ende des sich selbst unterhaltenden Entzündungskreislaufes steht die Umwandlung der exsudativen Alveolitis in die in der Regel therapieresistente sklerosierende Alveolitis, bei der es durch die starke Alveolenwand-Verdickung und durch die Rarefizierung der Gefäße zu einer Diffusions- und Perfusionsstörung kommt.

Humorale Mediatoren in der Frühphase des ARDS

Eicosanoide, Zytokine, Sauerstoffradikale und Proteasen spielen eine besondere Rolle in der Frühphase des ARDS. Thromboxan A₂ als auch die Cysteinyl-Leukotriene sind nennenswerte Mediatoren aus der Gruppe der Eicosanoide, welche eine prä- und postkapillare Vasokonstriktion in der Lungenstrombahn verursachen können. Weiter Mediatoren aus dieser Gruppe, wie die Lipoxygenase-Produkte der Arachidonsäure, können zu einer Permeabilitätserhöhung in der pulmonalen Mikrozirkulation führen. Leukotrien B₄ gehört zu den stärksten pulmonal freigesetzten chemotaktischen Agenzien. Prostanoiden (PGI₂, PGE₂), welche ebenfalls beim ARDS vermehrt gebildet werden, wirken vasodilatativ und hemmen teilweise die vasokonstriktorische Wirkung der Eicosanoide, antagonisieren aber auch die für die Perfusionsverteilung wichtige hypoxisch bedingte Vasokonstriktion.

Die granulozytären oder aus Makrophagen freigesetzten Sauerstoffradikale wirken vasokonstriktorisch und sind in der Lage, in höherer Konzentration ein Leakage in der pulmonalen Mikrozirkulation zu verursachen. Erwähnenswerte pulmonal liberierte Zytokine sind der Tumor-Nekrose-Faktor sowie das Interleukin 8, welches ebenfalls sehr stark chemotaktisch wirkt.

Therapie

Die Therapie des ARDS konzentriert sich auf die Störungen der Vasoregulation und des Gasaustausches, der endothelialen Permeabilität und der Surfactantgenese. Veränderungen der pulmonalen Vasomotion in der exsudativen Frühphase des ARDS können durch vasodilatative Agenzien beeinflusst werden. Zum Einsatz kommen hierbei Endothelium

Derived Relaxant Factor (EDRF = Stickstoffmonoxid) sowie das Prostanoid PGI₂, welche transbronchial appliziert werden, was den Vorteil der Vermeidung einer systemischen Vasodilatation beinhaltet (Puybasset et al., 1994; Rossaint et al., 1993; Zapol et al., 1994; Walmrath et al., 1993; Walmrath et al., 1996[a]). Störungen der endothelialen Permeabilität können auf der Ebene der endothelialen Second Messenger (c-AMP, c-GMP) behandelt werden, wobei Substanzen zum Einsatz kommen, welche die Adenylatzyklase (z.B. Prostaglandin E₁) und die Guanylatzyklase (NO und NO-Donatoren) aktivieren sowie Hemmstoffe der entsprechenden Phosphodiesterasen (Suttorp et al., 1991; Suttorp et al. 1996; Suttorp et al. 1993). Eine weitere therapeutische Möglichkeit stellt die transbronchiale Surfactantapplikation dar (Joka & Obertacke, 1989; Walmrath et al., 1996[b]).

3. Inflammation und Immunantwort – Rolle polymorphkerniger neutrophiler Leukozyten

3.1. Übersicht: Funktion und Steuerung granulozytärer Mechanismen

Neutrophile Granulozyten gehören zu den professionellen Phagozyten der Immunabwehr. Sie sind in der Lage sowohl eingedrungene Bakterien als auch beschädigte und abgestorbene Zellen des Organismus zu phagozytieren. Die Phagozytose erfolgt in intrazellulären Kompartimenten, welche als Phagosomen bezeichnet werden. Die intrazelluläre Abtötung erfolgt simultan durch ein Arsenal oxidativer und nicht-oxidativer zytotoxischer Agenzien (Smith, 1994). Die nicht-oxidative Abtötung wird vermittelt durch die Freisetzung lysosomaler Enzyme (Degranulation), wohingegen die oxidative Zellzerstörung durch Sauerstoff-Metabolite erfolgt, welche von der granulozytären NADPH-Oxidase generiert wurden (Oxidativer Burst) (McPhail & Harvath, 1994). Obwohl die Zellzerstörung intrazellulär erfolgt, kann die inadäquate Freisetzung zytotoxischer Moleküle in die extrazelluläre Matrix zur Beschädigung des Körpergewebes führen (Weiss, 1989). Der Granulozyt wird gesteuert durch inflammatorische Mediatoren, die sowohl von Prokaryonten (Formylpeptide, z.B. fmlp (Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin = chemotaktischer Rezeptorligand)) abgegeben, aus Plasmabestandteilen (Komplementfaktoren) freigesetzt oder von anderen Wirtszellen (Lipidmediatoren, Leukotriene) synthetisiert werden können (Grimminger et al., 1994). Diese Mediatoren interagieren mit spezifischen Rezeptoren auf der Plasmamembran des Granulozyten, wodurch es zur Aktivierung einer Reaktionskaskade

kommt, die in ihrer Gesamtheit als Signaltransduktion bezeichnet wird. Diese biochemischen Ereignisse schließen das Koppeln eines Guanin-Nukleotid-Proteins (G-Protein) an den Rezeptor genauso ein wie die Aktivierung von Phospholipasen, die Bildung von „second messengers“ sowie die Aktivierung von Proteinkinasen (McPhail & Harvath, 1994).

3.2. Degranulation

Die abgeschlossenen zytosolischen Kompartimente (Granula) von Neutrophilen Granulozyten werden während der Reifezeit des Granulozyten gebildet, die vom Myeloblasten über mehrere Stadien bis hin zum reifen segmentierten Granulozyten reicht (Bainton & Farquhar, 1966; Borregaard et al., 1995). Der Inhalt der zu unterscheidenden Granula besteht aus den Granula-Proteinen, die zur entsprechenden Zeit des jeweiligen Reifestadiums gebildet wurden. Nach dem Abschluß der Granula-Entstehung kommt es zur Bildung von sekretorischen Vesikeln (Borregaard & Cowland, 1997). Granula sind Lagerungs-Organellen, in welchen der Granulozyt seine proteolytischen und bakteriziden Proteine aufbewahrt, die er entweder in seine Umgebung oder in die phagozytotische Vakuole freisetzen kann. Darüber hinaus stellen die Granula ein Reservoir für Membranproteine dar, welche in die Plasmamembran integriert werden, wenn die Granula zum Zweck der Exozytose mit der Plasmamembran verschmelzen (Borregaard et al., 1983; Todd et al., 1984). Kommt es zur Fusion der Granula mit der Plasmamembran, so erfolgt die Freisetzung des enzymatischen Inhaltes ins Gewebe. Findet dies in einem unkontrollierten Maße statt, wie man es in überschießenden inflammatorischen Prozessen beobachten kann, so hat dies eine Degeneration von Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix und Nekrose zur Folge (Weiss, 1989). Der Inhalt der zytosolischen Kompartimente dient als Klassifikationsmerkmal der verschiedenen Granula. Die verschieden klassifizierten Granula enthalten Proteine, welche sie mit anderen Klassen gemeinsam haben. Es gibt jedoch charakteristische Proteine, die in den einzelnen zytosolischen Kompartimenten vorherrschen und so zu ihrer Einteilung herangezogen werden können. Man unterscheidet auf diese Weise drei Klassen von Granula sowie die sekretorischen Vesikel (Abb.4).

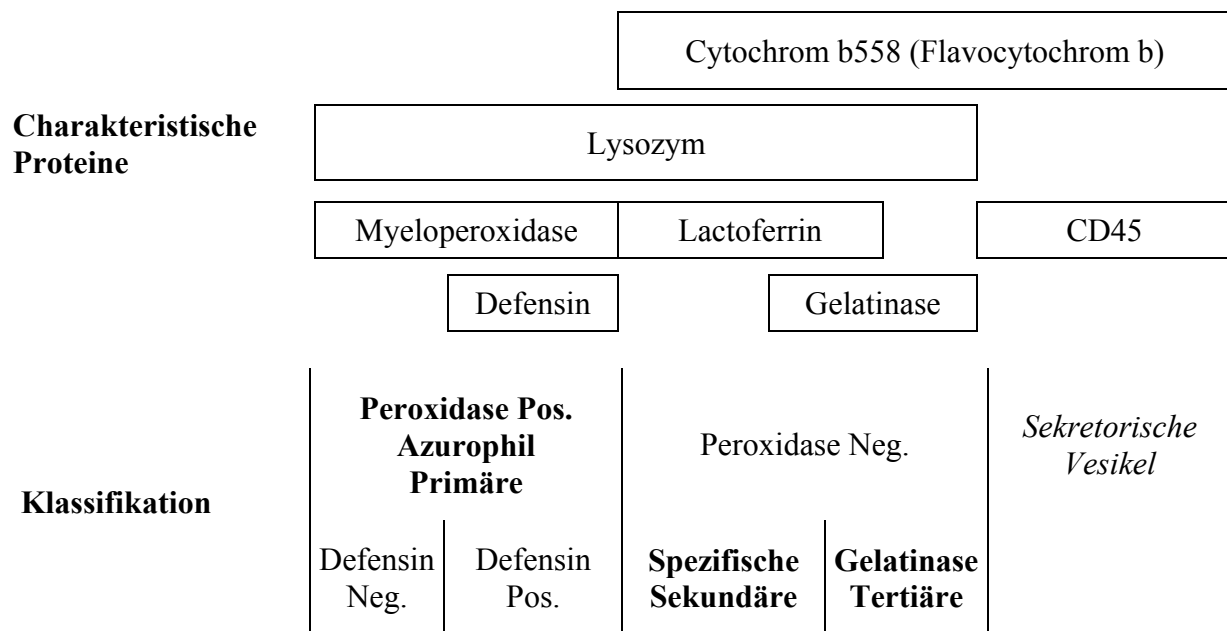


Abbildung 4

Klassifikation der Granula von Neutrophilen Granulozyten. Peroxidase-positive (Azurophile oder Primäre) Granula werden charakterisiert durch ihren Inhalt an Myeloperoxidase und können noch weiter unterteilt werden in Defensin-reiche und Defensin-arme Granula. Die Peroxidase-negativen Granula werden getrennt in Spezifische (Sekundäre) und Gelatinase (Tertiäre) Granula, aufgrund ihres relativen Inhaltes an Lactoferrin und Gelatinase. Lysozym ist Bestandteil aller Granula. Die Sekretorischen Vesikel teilen sich einige ihrer Membranproteine mit Peroxidase-negativen Granula, wohingegen andere für die Vesikel spezifisch sind. Cytochrom b558 ist die zentrale Komponente der NADPH-Oxidase (adaptiert nach Borregard et al., 1997).

Peroxidase-positive (primäre oder azurophile) *Granula* sind diejenigen, welche als erste in der Reifungszeit des Granulozyten (Promyelozyt) auftreten. Ihr Hauptbestandteil ist die Myeloperoxidase, welche den größten Teil des relativ harmlosen NADPH-Oxidase-Produktes H₂O₂ in das bakterizide HOCl transformiert (Bainton et al., 1971; Weiss et al. 1982). Weitere Bestandteile sind neutrale Proteasen (Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3), saure Hydrolasen (α -Mannosidase, N-Acetyl- β -Glucosaminidase, Phospholipase A₂) und antimikrobielle Bestandteile (Defensin, Lysozym, BPI (bactericidal / permeability increasing protein)) (Borregaard, 1996). Neben der physiologischen Bedeutung der Inhaltsstoffe der azurophilen Granula bei der Abtötung von Bakterien innerhalb der phagozytotischen Vakuole hat besonders die Elastase eine Bedeutung für extrazelluläre Gewebedegradierung, bei der sogar intakte Zellen beschädigt werden (Janoff, 1985).

Spezifische (sekundäre) *Granula* treten in einem späteren Reifestadium (Metamyelozyt) des Neutrophilen auf und besitzen als Hauptbestandteil Lactoferrin, dessen Funktion bisher noch nicht bekannt ist (Leffel & Spitznagel, 1972; Borregaard et al., 1993). Die Inhaltsstoffe spezifischer Granula werden hauptsächlich in den Extrazellularraum abgegeben und leisten somit einen Beitrag zur extrazellulären Abtötung von Keimen sowie zur gerichteten Bewegung der Granulozyten durchs Gewebe (Chemotaxis). Eine Metalloprotease, die Kollagenase, ist ein weiterer Bestandteil der Granula und ist für die genannte gerichtete Bewegung des Granulozyten von Bedeutung, da sie die Fähigkeit besitzt, das Kollagen der extrazellulären Matrix zu degradieren (Hasty et al. 1986; Leffel & Spitznagel, 1974). Des Weiteren besitzen sie Urokinase-type Plasminogen Aktivator (uPA), sowie Vitamin B₁₂-bindendes Protein. Letztendlich enthält die Granula-Membran noch verschiedene Rezeptorproteine (FMLP-Rezeptor, TNF α -Rezeptor, Fibronectin-Rezeptor), die bei der Verschmelzung mit der Plasmamembran im Rahmen der Exozytose in diese übergehen und so für die Interaktion mit der Umgebung zur Verfügung stehen (Borregaard & Cowland, 1997).

Gelatinase (tertiäre) *Granula* werden am Ende der Granulozyten-Reifungszeit gebildet und ähneln den spezifischen Granula (Burg & Pillinger, 2001). Sie enthalten jedoch im Unterschied zu diesen in großen Mengen die Metalloprotease Gelatinase, die wie Kollagenase in einer latenten Form ausgeschüttet wird und erst durch HOCl, welches durch die Myeloperoxidase gebildet wurde, oder durch nicht-oxidative Mechanismen aktiviert werden muß (Weiss et al., 1983; Burg & Pillinger, 2001). Gelatinase hat ein breiteres Substratspektrum als Kollagenase (Yager & Nwomeh, 1999).

Die Bildung der *Sekretorischen Vesikel* erfolgt erst nachdem die Granula-Entstehung abgeschlossen ist. Sie besitzen eine besondere Bedeutung aufgrund ihrer umfangreich rezeptorbestückten Membran (Calafat et al. 1993), die im Verlaufe der Exozytose mit der Plasmamembran verschmilzt und so den Granulozyten in eine z.B. β_2 -integrin präsentierende Zelle verwandelt, die von einem allgemein passiven Zustand (während der Zirkulation) in einen Aktivierten (fertig zur Migration ins Gewebe) wechselt. Darüber hinaus enthält die Membran der Sekretorischen Vesikel, wie die der Peroxidase-negativen Granula, das Flavocytochrom b₅₅₈. Der einzig bekannte intravesikale Inhalt ist Plasma (Weiss, 1989).

3.3. NADPH Oxidase System

Neutrophile Granulozyten sind die Zellen, welche sich als erste in einem inflammatorischen Gebiet ansammeln und eingewanderte Keime phagozytieren und abtöten. Die Phagozytose ist verbunden mit einem explosionsartigen Sauerstoffverbrauch des Granulozyten, der als „respiratory burst“ bezeichnet wird und erstmals 1933 von Baldrige und Gerard beobachtet wurde. Der Vorgang des „respiratory burst“ resultiert in der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die durch den Multienzymkomplex NADPH Oxidase katalysiert werden. Dieser Multienzymkomplex besteht aus sieben bis jetzt bekannten Proteinen, die sich in membranständige und zytosolische Proteine unterteilen lassen. Die zentrale Komponente ist das transmembranöse Flavocytochrom b_{558} , das aus den Bausteinen $gp91^{phox}$, $p22^{phox}$ und $Rap1A$ besteht und möglicherweise als NADPH-bindendes Protein dient bzw. sehr wahrscheinlich den gesamten Elektronen-Transportapparat enthält (Parkos et al., 1987; Quinn et al., 1992; DeLeo & Quinn, 1996). Die zytosolischen Komponenten bestehen aus den Proteinen $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ und $Rac2$, wobei die Proteine $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und $p40^{phox}$ einen gemeinsamen Komplex bilden, der nach der Aktivierung als ein Ganzes zur Plasmamembran transloziert und sich dort mit den membranständigen Komponenten bindet (Park et al., 1992; Park et al., 1994; Iyer et al., 1994). $Rac2$ ist im Zytosol an einen Guanin Nukleotid Austauschfaktor (GDI) gebunden, welcher $Rac2$ möglicherweise in Lösung hält. Während der Aktivierung kommt es zur Separation der beiden Komponenten und $Rac2$ transloziert simultan und unabhängig von den anderen zytosolischen Komponenten zur Plasmamembran (Abo et al., 1994; Pick et al., 1993). Die Aktivierung wird unter anderem eingeleitet durch die Proteinkinase C (PKC) abhängige Phosphorylierung des Proteins $p47^{phox}$, woraufhin der zytosolische Komplex mit Hilfe des Zytoskeletts zur Plasmamembran transloziert und sich dort mit dem membranständigen Teil zum aktiven Enzym verbindet (Abb.5) (Burg & Pillinger, 2001).

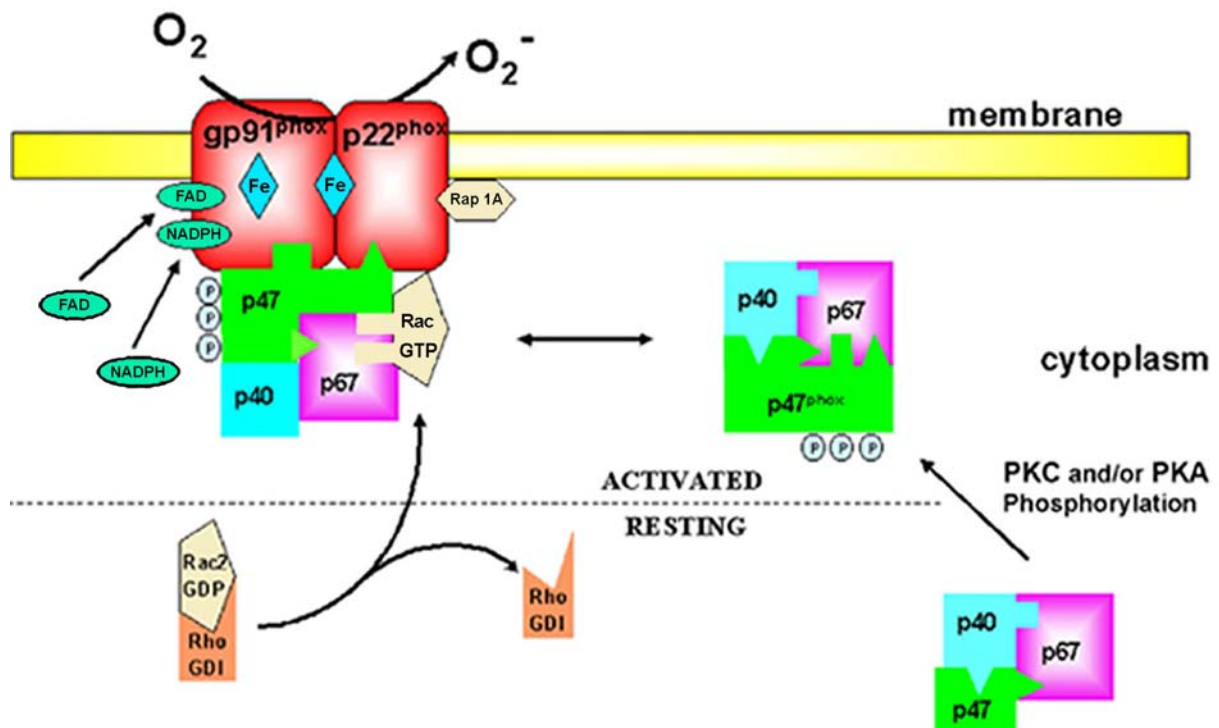
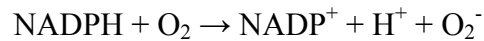


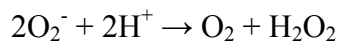
Abbildung 5

Dieses Modell zeigt den Übergang vom ruhenden in den aktivierten Multienzymkomplex NADPH Oxidase. Die zentrale Komponente ist das transmembranöse Flavocytochrome b₅₅₈, das aus den Bausteinen gp91^{phox}, p22^{phox} und Rap1A besteht. Die zytosolischen Komponenten bestehen aus den Proteinen p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} und Rac2, wobei die Proteine p47^{phox}, p67^{phox} und p40^{phox} einen gemeinsamen Komplex bilden, der nach der Aktivierung (Phosphorylierung mittels PKC) als ein Ganzes zur Plasmamembran transloziert und sich dort mit den membranständigen Komponenten bindet. Rac2 ist im Zytosol an einen Guanine Nukleotid Austauschfaktor (GDI) gebunden. Während der Aktivierung kommt es zur Separation der beiden Komponenten, und Rac2 transloziert simultan und unabhängig von den anderen zytosolischen Komponenten zur Plasmamembran. Der Multienzymkomplex katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxidanion Radikal (O₂⁻), wobei NADPH als Reduktionsmittel dient (abgewandelt übernommen von DeLeo et al., 1996).

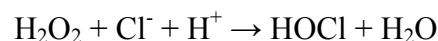
Der Multienzymkomplex katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxidanion Radikal (O_2^-) auf Kosten von NADPH, welches im Pentosephosphatweg gebildet wurde, bei dieser Reaktion als Reduktionsmittel dient und dabei selbst oxidiert wird. Dabei wird auf den molekularen Sauerstoff ein Elektron übertragen (Babior, 1984).



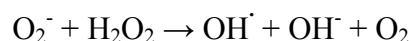
Das entstandene Superoxidanion Radikal, welches selbst keine bakterizide Wirkung besitzt, reagiert schnell mit sich selbst und es erfolgt die Dismutation zu Hydrogenperoxid (H_2O_2). Dieses Produkt besitzt eine schwach bakterizide Wirkung und dient als Ausgangsprodukt für stark mikrobizide Oxidantien (Babior, 1984; Casimir & Teahan, 1994).



Aus Hydrogenperoxid können zwei weitere Gruppen von mikrobiziden Oxidantien gebildet werden. Das sind erstens oxidierte Halogene und zweitens oxidierende Radikale. Das in den primären Granula lokalisierte Enzym Myeloperoxidase katalysiert die Entstehung ersterer. Dabei werden Chloridionen mit Hilfe von Hydrogenperoxid zu Hypochlorsäure (HOCl) oxidiert.



Das einzige Mitglied der zweiten Gruppe ist das Hydroxylradikal (OH^\cdot), welches durch eine metallkatalysierte Reaktion zwischen O_2^- und H_2O_2 gebildet wird.



Die gebildeten Oxidantien entfalten ihre destruktive Wirkung auf unterschiedliche Art und Weise. Sie oxidieren Nukleinsäuren und Aminosäuren, können α_1 -Antitrypsinase inaktivieren und aktivieren die inaktiven Vorstufen von Kollagenase und Gelatinase. Zusätzlich zum bakteriziden Effekt haben die reaktiven Verbindungen die Fähigkeit, körpereigenes Gewebe zu zerstören (Weiss, 1989; Weiss et al., 1985). Die Systeme von Granula und NADPH-Oxidase sind funktionell miteinander verknüpft. Dies zeigt sich zum einen an der Unabdingbarkeit der Myeloperoxidase (Primäre Granula) für die Radikalbildung und zum

anderen an der Aktivierung der Kollagenase- und Gelatinase-Vorstufen durch die gebildeten Radikale.

3.4. “Priming“ von Granulozyten und Signaltransduktion

3.4.1. Lipopolysaccharid priming

“Priming“ ist ein Prozeß, bei dem es zu einer potenzierten Antwort von Neutrophilen Granulozyten auf einen zweiten aktivierenden Stimulus (z.B. fmlp, Calcium Ionophore A23187) kommt, nachdem die Zellen zuvor mit einer primenden Substanz (z.B. TNF α , LPS, PAF [Plättchen-aktivierender Faktor], GM-CSF [Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor]) inkubiert wurden. Die primende Substanz ihrerseits löst keine Zellreaktionen (z.B. Oxidativer Burst, Degranulation) aus, es sei denn sie wird in sehr hohen Konzentrationen verabreicht. Darüber hinaus muß sie für eine bestimmte Zeit auf die Zellen einwirken, bevor diese mit einem aktivierenden Agens stimuliert werden. Die optimale priming-Zeit, die zum maximalen Effekt führt, beträgt für LPS 2 Stunden (Guthrie et al., 1984). Die Konzentration, in welcher LPS in der Lage ist, die Zellen in eine erhöhte Aktivität zu versetzen, hängt von einem weiteren Parameter ab und zwar vom akute Phase-Protein “Lipopolysaccharid bindendes Protein“ (LBP), welches im Serum in einer Konzentration von 1-24 $\mu\text{g/ml}$ vorkommt. LPS formt mit LBP einen Komplex, wodurch die aktivierende LPS-Wirkung um den Faktor 100-1000 potenziert wird und damit LPS Konzentrationen im ng/ml Bereich ausreichend sind, um Zellen zu stimulieren (Martin et al., 1992; Mathison et al., 1992; Hailman et al., 1994). In vivo weisen septische Geschehen eben solche Konzentrationen auf (Deventer van et al., 1988). Die Bindungsstelle für den LPS-LBP Komplex ist der CD14 Rezeptor auf der Zellmembran (mCD14) von myeloischen Zellen, der mit einem Glycerophosphatidylinositol-Fortsatz in der Zellmembran verankert ist. Dieser Fortsatz durchdringt nicht die volle Stärke der Membran, so daß bis jetzt noch nicht endgültig bekannt ist, wie das Signal durch die Plasmamembran transduziert wird (Tobias & Ulevitch, 1994; Antal-Szalmas, 2000). Neben dem zellgebundenen CD14 Rezeptor gibt es noch einen löslichen, im Serum vorhandenen CD14 Rezeptor (sCD14), der für die Bindung und Aktivierung von Endothel- und Epithelzellen verantwortlich ist. Der zuletzt gefundene und vielversprechendste CD14-Korezeptor, der wahrscheinlich für die weitere Signaltransduktion verantwortlich ist, ist ein Mitglied der IL-1 Rezeptor Gen-Familie und wird als “toll-like-receptor“ (TLR) bezeichnet (Medzhitov et al., 1997). mCD14 beziehungsweise sCD14 dienen

wahrscheinlich zusammen mit LBP als ein sensitives Überbringer-System, welches LPS bindet und als Monomer zu dem Signal- transduzierenden Protein TLR transportiert (Gerard, 1998). Es wurde beschrieben, daß eine ganze Reihe von intrazellulären Kinasen durch die Bindung von LPS an CD14 aktiviert werden. Dazu gehören die Thyrosin-Kinase, die Mitogen-Aktivierte-Tyrosin-Kinase, sowie die Proteinkinasen A und C. Zusätzlich wurden die Aktivierung von G-Proteinen, verschiedener Phospholipasen (PLC, PLD), die Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Triphosphat (IP₃), der Anstieg von intrazellulärem Kalzium, sowie die Translokation von NF-κB (Nuclear Factor kappa B) beschrieben (Sweet & Hume, 1996; Delpedro et al., 1998).

3.4.2. Signaltransduktionsweg zur Aktivierung der NADPH Oxidase

Die Bildung von Superoxidanion Radikal durch den Multiproteinkomplex NADPH Oxidase wird begleitet von einer intensiven Phosphorylierung der zytosolischen Proteinkomponente p47^{phox}. Diese Phosphorylierung wird katalysiert durch ein Isoenzym der Proteinkinase C (PKC) Familie, welches nach fmlp-Stimulation des Granulozyten genau wie p47^{phox} selbst zur Plasmamembran transloziert (Dang et al., 2001; Condliffe et al., 1998) und dort aktiviert wird. Dieser Schritt steht am Ende der Signaltransduktionskette, die mit der Bindung von fmlp an seinen spezifischen Rezeptor beginnt. Dieser fmlp-Rezeptor ist gekoppelt an ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein, welches mit einer seiner Untereinheiten die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Die Aktivierung der PLC führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). Diese Reaktion führt zur Entstehung der aktiven "Second Messengers" Myoinositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) und 1,2-diacylglycerol (DAG). IP₃ löst die Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Kalzium aus, welches zusammen mit dem gebildeten DAG die Proteinkinase C aktiviert (Casimir & Teahan, 1994). Die Hemmung der PKC durch einen geeigneten Inhibitor verhindert die Translokation von p47^{phox} zur Plasmamembran und hemmt die Superoxidanion Radikal Produktion (Burg & Pillinger, 2001; DeLeo & Quinn, 1996). Bisindolylmaleimide GF 109 203X ist ein hoch selektiver PKC-Inhibitor, der in der Lage ist, die Bildung von Superoxidanion Radikal zu hemmen (Cabanis et al., 1996). Weitere Enzyme, die wahrscheinlich ebenfalls an der Aktivierung der NADPH Oxidase auf anderen Wegen beteiligt sind, sind die Phospholipase D (PLD), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-K), Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK), um nur einige zu nennen, sowie möglicherweise bisher noch unbekannte Mediatoren (Abb.6) (Condliffe et al., 1998).

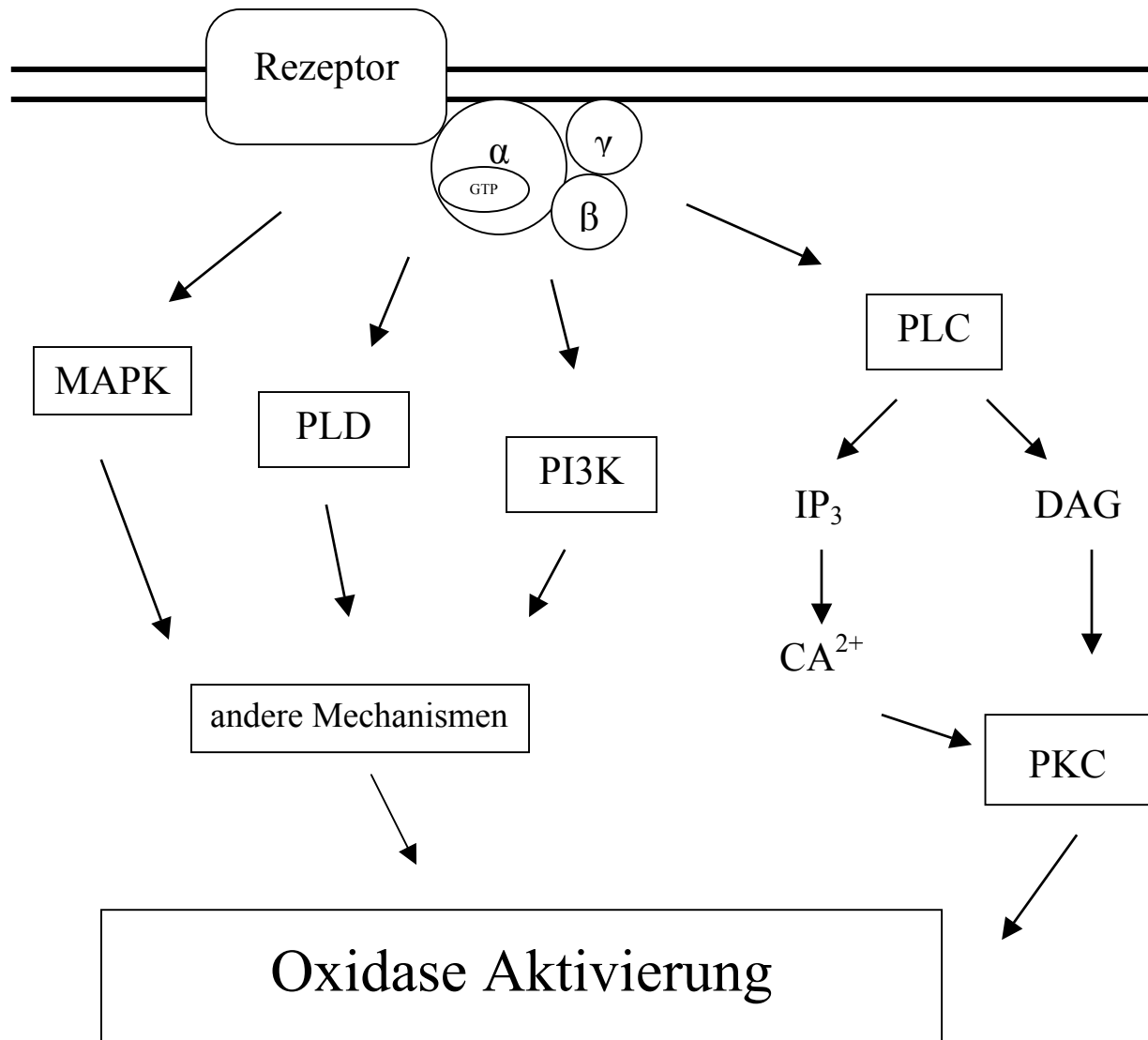


Abbildung 6

Die Abbildung zeigt die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der NADPH Oxidase. Die Signaltransduktionskette beginnt mit der Bindung von fmlp an seinen spezifischen Rezeptor. Dieser fmlp-Rezeptor ist gekoppelt an ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein, welches mit einer seiner Untereinheiten die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Die Aktivierung der PLC führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) und damit zur Entstehung der aktiven "Second Messengers" Myoinositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) und 1,2-diacylglycerol (DAG). IP₃ löst die Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Kalzium aus, welches zusammen mit dem gebildeten DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, die wiederum die NADPH Oxidase aktiviert. Weitere Enzyme, die wahrscheinlich ebenfalls an der Aktivierung der NADPH Oxidase auf anderen Wegen beteiligt sind, sind die Phospholipase D (PLD), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-K), Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK), sowie möglicherweise bisher noch unbekannte Mediatoren.

4. Regulationsmechanismen granulozytärer Funktionen

Eine Entzündung ist normalerweise eine lokalisiert ablaufende protektive Immunantwort, die durch eine mikrobielle Infektion oder durch Zell- und Gewebeerletzungen ausgelöst wird. Der Körper besitzt eine umfangreiche Sammlung von pro-inflammatorischen Mediatoren, die den entzündlichen Prozeß auslösen und steuern sowie ein Arsenal an anti-inflammatorischen Mediatoren, die den Körper einerseits vor unnötigen Entzündungsgeschehen schützen und andererseits den entzündlichen Prozeß steuern und beenden (Kubes, 1993). Zu diesen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren gehören die Gruppen der **Zytokine** und der **Lipidmediatoren**.

4.1. Zytokine

Zytokine sind Polypeptidhormone, die als Botenstoffe mit sowohl auto- als auch parakriner Funktion von immunologisch kompetenten Zellen synthetisiert und sezerniert werden. Sie haben teilweise überlappende Funktionen, wie beispielsweise die pyrogene Wirkung von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 . Der von ihnen ausgelöste Effekt hängt von der Signalübertragung und der Enzymsausstattung der Rezeptorzelle ab.

Bei der Entwicklung der Sepsis spielen Zytokine eine bedeutende Rolle. Sie sind Teil eines komplexen Netzwerkes, das bisher jedoch nur bruchstückhaft beschrieben werden kann.

Dies liegt zum einen daran, daß die experimentell induzierte Sepsis meist nur durch einmalige Applikation eines Toxins eingeleitet wird und die Untersuchungen nach Abklingen der hyperinflammatorischen Phase abgeschlossen werden. Auf diese Weise kann jedoch nicht das gesamte Bild der Sepsis mit Übergang zur Immunparalyse erfaßt werden. Zum anderen ist bei der experimentell induzierten Sepsis der Infektionsstart genau definiert, während bei Patienten mit Sepsis oder Sepsisverdacht der Beginn der Erkrankung oft nicht erkennbar ist (Grimminger et al., 1997).

Die Bedeutung der unterschiedlichen Zytokine und deren zeitliches Auftreten wurde bereits im Abschnitt der Sepsis behandelt und soll hier nicht weiter erörtert werden. Genauer beschrieben werden soll jedoch das Interleukin-13 (IL-13).

4.1.1. Interleukin-13 (IL-13)

Charakteristisch für die immunparalytische Phase der Sepsis ist das Auftreten des Zytokins IL-13 neben anderen anti-inflammatorischen Zytokinen wie dem IL-10 und IL-4.

IL-13 wurde ursprünglich als ein Produkt von aktivierten TH2-Helferlymphozyten identifiziert. IL-13 ist ein nicht-glykosyliertes Protein aus 132 Aminosäuren, es besitzt eine relative Molekularmasse von 10 kDa und hat eine Reihe immunmodulierender Eigenschaften auf B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, PMN und Endothelzellen. *In vitro* unterdrückt IL-13 die von Monozyten produzierten pro-inflammatorischen Zytokine wie TNF α , IL-1, IL-6 sowie IL-8 (Woods et al., 2000). Außerdem verstärkt es die Produktion von IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) in Monozyten und PMN (Muzio et al., 1994).

Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von IL-13 und IL-10 sind sehr ähnlich. Beide reduzieren die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Monozyten und Makrophagen. *In vivo* haben sowohl IL-13 als auch IL-10 in einem tierexperimentellen Endotoxin-Schock-Modell eine Steigerung der Überlebenszeit durch die Reduzierung von systemischen TNF α Spiegeln erreicht (Lentsch et al., 1999).

IL-13 induziert die Differenzierung von Monozyten sowie die B-Lymphozyten Proliferation und Differenzierung und ist neben IL-4 an dem B-lymphozytären Immunglobulin „Isotype-Switching“ beteiligt. Sowohl IL-13 als auch IL-4 induzieren den Immunglobulin Isotyp-Wechsel zugunsten der Immunglobuline IgG4 und IgE (Lentsch et al., 1999, Punnonen & de Vries, 1994).

IL-13 u. IL-4 sind dafür bekannt, daß sie die Bildung des Oberflächenmoleküls VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) auf Endothelzellen induzieren. Eosinophile, welche den entsprechenden „counter-receptor“ für VCAM-1 besitzen, können im Gegensatz zu PMN somit am Endothel adhärent werden (Bochner et al., 1995).

4.2. Lipidmediatoren

Zu der Gruppe der bioaktiven Lipide die von den Granulozyten gebildet werden, gehören in erster Linie die Lipoxygenase-Metaboliten der Arachidonsäure (Leukotriene) sowie acetylierte Derivate des Membranlipids Phosphatidylcholin, wie z.B. der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF). Beide Substanzgruppen können *de novo* synthetisiert oder im Falle von PAF aus dem Deacylierungs-Reacylisierungs-Pathway gewonnen werden. Sie können in großen Mengen von aktivierten Granulozyten freigesetzt werden und zeichnen sich durch eine extrem kurze biologische und chemische Halbwertszeit aus. Sie entfalten daher ihre Aktivität in ihrer unmittelbaren Umgebung (Lokalmediatoren) (McColl & Showell, 1994).

4.2.1. Eicosanoide

Einführung

Unter dem Begriff der Eicosanoide ist eine Gruppe von biologisch aktiven, proinflammatorischen oxygenierten Fettsäuren zusammengefasst, deren Hauptbestandteile die Leukotriene, Prostaglandine, Thromboxane, Cytochrom-P450 Derivate und Lipoxine darstellen (Henderson, 1991). Unter Standardernährung ist das Ausgangssubstrat der Eicosanoidsynthese die Arachidonsäure (AA), eine vierfach ungesättigte C20-Fettsäure, die im Falle der Granulozyten aus dem Membranphospholipid Phosphatidylcholin durch eine oder mehrere Phospholipase A₂-Subtypen abgespalten wird. Den initialen Schritt stellt der Rezeptor-vermittelte Ca²⁺ Ionen-Einstrom und die damit verbundene Translokation der zytosolischen Phospholipase A₂ zur Zellmembran dar (McColl & Showell, 1994). Neben der Fähigkeit endogene Arachidonsäure freizusetzen, können PMN auch exogen angebotene Arachidonsäure in der Enzymkaskade metabolisieren, was zu einer starken Potenzierung der Leukotriensynthese führt. *In vivo* sind während eines entzündlichen Geschehens Zelltypen wie Mastzellen oder vaskuläre Endothelzellen an der Freisetzung von Arachidonsäure beteiligt (Grimminger et al., 1991; Murakami et al., 1992).

Die aus dem Membranphospholipid freigesetzte Arachidonsäure wird enzymatisch in biologisch aktive Mediatoren überführt. Je nach Art des Enzyms, das den ersten Reaktionsschritt katalysiert, unterscheidet man den Zyklooxygenase-, Cytochrom P450- und den Lipoxygenase-Weg. Die Aktivierung des Zyklooxygenaseweges führt zur Bildung der Prostaglandine, wohingegen die Umsetzung im Lipoxygenase-Weg zur Bildung von Leukotrienen und Lipoxinen führt. Da Granulozyten nur eine fragliche Zyklooxygenase-Aktivität besitzen, wird hier ausschließlich der Lipoxygenase-Weg beschrieben (McColl & Showell, 1994).

Lipoxygenaseprodukte der Arachidonsäure

(Hammarström, 1983; Samuelson et al., 1980; Henderson, 1994) (Abb.7)

Drei strukturelle Substanzklassen gehören in erster Linie zu dieser Gruppe:

1. Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs)
2. Leuktrien B₄ (LTB₄) und dessen Derivate
3. Cysteinyl-Leukotriene (LTC₄, LTD₄, LTE₄)

Aus der AA entstehen durch die enzymatische Umsetzung verschiedener (5-, 8-, 9-, 11-, 12-, oder 15-) Lipoxygenasen die entsprechenden Hydroperoxyeicosatetraensäuren (HPETEs), welche durch eine katalytische Reaktion des Glutathion-Peroxidase-Systems in die resultierenden Monohydroxyeicosatetraensäuren (HETEs) überführt werden.

Da aus dem 5-Lipoxygenaseweg die biologisch aktiven Leukotriene hervorgehen, ist dieser von besonderer Bedeutung. Die Kette der Leukotriensynthese beginnt, wenn ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg die ATP-stimulierte 5-Lipoxygenase aktiviert und diese vom Zytosol zur Zellmembran transloziert. 5-HPETE wird durch Dehydratation in den Epoxidintermediaten Leukotrien A_4 (LTA_4) überführt. LTA_4 zerfällt spontan durch Hydrolyse zu den biologisch inaktiven Diastereomeren-Paaren des 6-trans- LTB_4 und des 5, 6-DiHETE, wenn kein enzymatischer Umbau zum LTB_4 oder zu den Cysteinyl-Leukotrienen erfolgt.

Granulozyten sowie Monozyten und Makrophagen besitzen das Enzym LTA_4 -Hydrolase, welches das kurzlebige LTA_4 zum biologisch hochaktiven LTB_4 katalysiert, wohingegen in Eosinophilen, Endothelzellen und Mastzellen die Bildung von Cysteinyl-Leukotrienen durch die ihnen eigene Glutathion-S-Transferase eingeleitet wird.

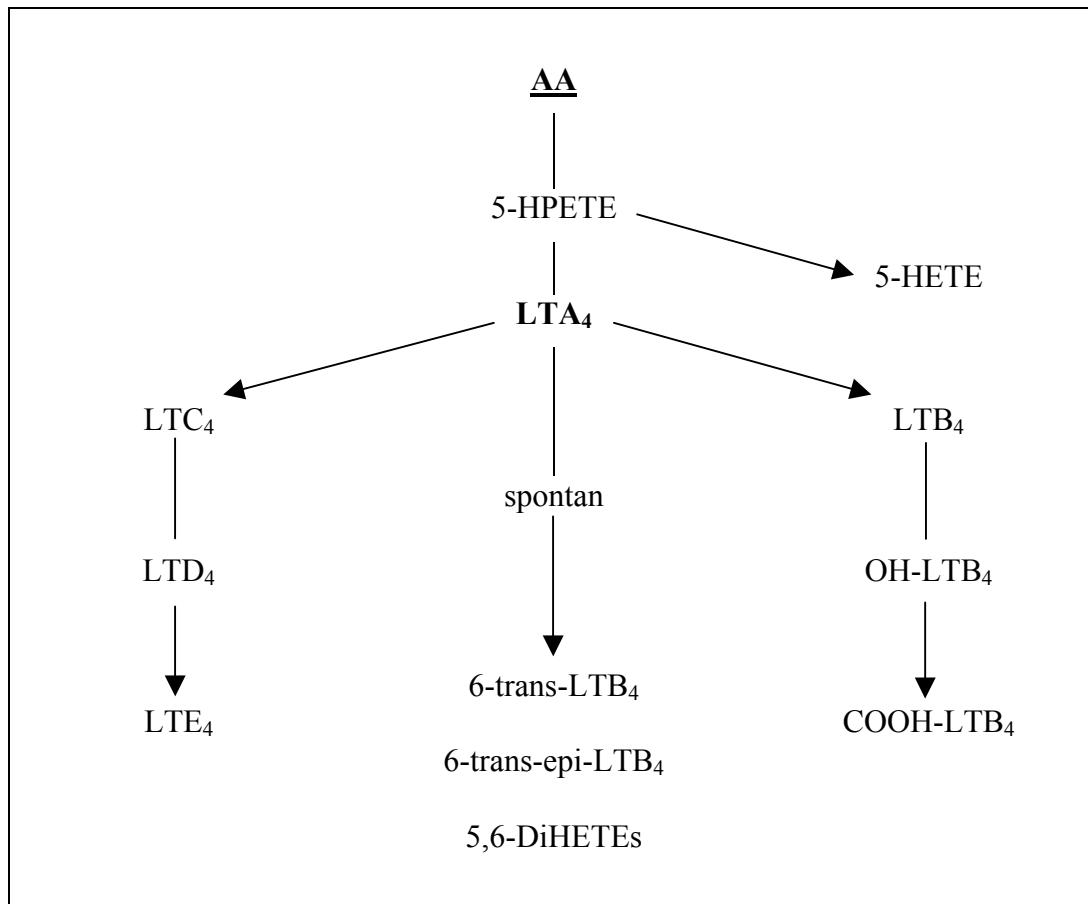


Abbildung 7

Schematische Übersicht der AA-Kaskade – Lipoxygenase-Weg. Dargestellt ist die Synthese des LTB₄ und seiner Abkömmlinge aus dem instabilen Intermediaten LTA₄ sowie die Entstehung der Cysteinyl-Leukotriene (LTC₄, LTD₄ und LTE₄). Der gleichfalls ablaufende spontane Zerfall des LTA₄ in seine Diastereomeren-Paare 5,6-DIHETEs und 6-trans-LTB₄ ist im mittleren Kaskadenschenkel dargestellt.

Die Leukotriene haben ein weit gefächertes pro-inflammatorisches Wirkungsspektrum. Von den oben aufgeführten Vertretern des Lipoxygenaseweges besitzt insbesondere Leukotrien B₄ und in geringerem Maße auch 5-HETE eine starke chemotaktische Wirkung auf PMN. Überdies spielt LTB₄ eine zentrale Rolle bei der Induktion der Expression von endothelialen und leukozytären Oberflächenmolekülen, die für die Adhäsion und Transmigration der Neutrophilen ins perivaskuläre Gewebe von Nöten sind (Tonnesen, 1989). Ebenfalls führt die Konfrontation von PMN mit LTB₄ zu einer Rezeptor-vermittelten Degranulationsreaktion und der Freisetzung von lysosomalen Enzymen. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die prosekretorischen Effekte von Granulozyten-Aktivatoren wie dem Calcium-Ionophor A23187 oder dem bakterielle Tripeptid fmlp indirekt über endogen gebildetes LTB₄ oder PAF

vermittelt werden (McDonald et al., 1994; Hatzelmann et al., 1994; Zhou et al., 1993). Auch immunmodulatorische Fähigkeiten werden LTB_4 zugeschrieben: Es stimuliert die Myelopoese, verstärkt die Interleukin 6 Produktion in Monozyten und moduliert die Produktion von anderen Zytokinen ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) in mononukleären Zellen.

Die biologische Aktivität der Cysteinyl-Leukotriene unterscheidet sich erheblich von der des LTB_4 . Die Cysteinyl-Leukotriene wurden erstmalig als „the slow-reacting substance of anaphylaxis“ (SRS-A) beschrieben und werden hauptsächlich von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen synthetisiert (Murphy et al., 1992). Sie haben ein umfangreiches inflammatorisches Wirkspektrum, welches von starker postkapillärer Vasokonstriktion und Steigerung der Gefäßpermeabilität, wodurch es zur Plasmaexsudation und Ödembildung kommt, bis hin zur Verstärkung der mukösen Sekretion und Modulation des Immunsystems reicht (Samuelson et al., 1987).

Eine bemerkenswerte Eigenschaft ist die kooperative Leukotriensynthese, bei der nicht alle Komponenten des 5-Lipoxygenaseweges in ein und derselben Zelle lokalisiert sein müssen, damit die Leukotriensynthese stattfinden kann. PMN und Mastzellen sind in der Lage, gebildetes LTA_4 aktiv zu sezernieren. Thrombozyten und Kapillarendothelien hingegen besitzen die Fähigkeit, das von PMN gebildete LTA_4 aufzunehmen und es durch das ihnen eigene Enzym LTC_4 -Synthase in LTC_4 umzuwandeln (Feinmark & Cannon, 1986; Claesson & Haeggström, 1988). Somit übernimmt LTA_4 eine sog. „Antennen“-Funktion. Wenn kein direkter Kontakt („Rolling“ oder Adhärenz) zum Endothel besteht, zerfällt das sezernierte LTA_4 . Im umgekehrten Fall wird es von den Endothelzellen zum LTC_4 konvertiert und kann somit inflammatorisch wirksam werden (Grimminger et al., 1988).

4.2.2. Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)

Anfang der 70er Jahre wurde PAF als eine Substanz identifiziert, die von IgE stimulierten basophilen Granulozyten freigesetzt wird und die Fähigkeit besitzt, Thrombozyten zu aktivieren (Henson, 1969). Im Jahre 1979 wurde die chemische Struktur von PAF als 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine entschlüsselt (Demopolis et al., 1979; Blank et al., 1979).

Nachdem die biochemische Struktur bekannt war, konnten innerhalb kurzer Zeit noch einige andere Zellen wie eosinophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und ganz besonders PMN nicht nur als Zielzelle, sondern auch als Syntheseort für den Lipidmediatoren gefunden werden (Camussi et al., 1981).

PAF wird in neutrophilen Granulozyten über einen Deacylierungs-Reacylisierungs-Zyklus synthetisiert. Ein Membranphospholipid der Klasse 1-O-alkyl-2-acyl-glycero-3-phosphocholin ist das Ausgangssubstrat der PAF Synthese. Der initiale Schritt erfolgt durch die Ca^{2+} Ionen abhängige Translokation der zytosolischen Phospholipase A_2 zur Zellmembran und die nachfolgende Abspaltung der Acylgruppe von der C_2 -Position. Bei der auf diesem Weg freiwerdenden Fettsäure handelt es sich meist um Arachidonsäure, die als Vorläufer der Eicosanoide in den Lipoxygenasestoffwechsel eingeschleust werden kann. So können zwei potente Lipidmediatoren – LTB_4 und PAF – aus ein und dem selben Vorläufermolekül synthetisiert werden. Das nach dem ersten enzymatischen Schritt anfallende instabile Zwischenprodukt Lyso-PAF wird ebenfalls enzymatisch unter dem Einfluß einer Acetyltransferase an der C_2 -Position acetyliert. Bei diesem Schritt dient Acetyl-CoA als Essigsäure-Donator. Die Inaktivierung des so entstandenen PAF erfolgt in einer Rekonversion des PAF zu seinem Präkursor. Da sich die Enzyme des PAF-Anabolismus und die des PAF-Katabolismus (Acetylhydrolase und Acyltransferase) umgekehrt proportional zum zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel verhalten, läuft der Metabolismus im Zustand der Zellaktivierung in Richtung der PAF-Synthese (Blank et al., 1979; Mueller et al., 1984).

Das ineinandergreifende System des Aktivations- und Inaktivations- Metabolismus ist in Abb.8 dargestellt.

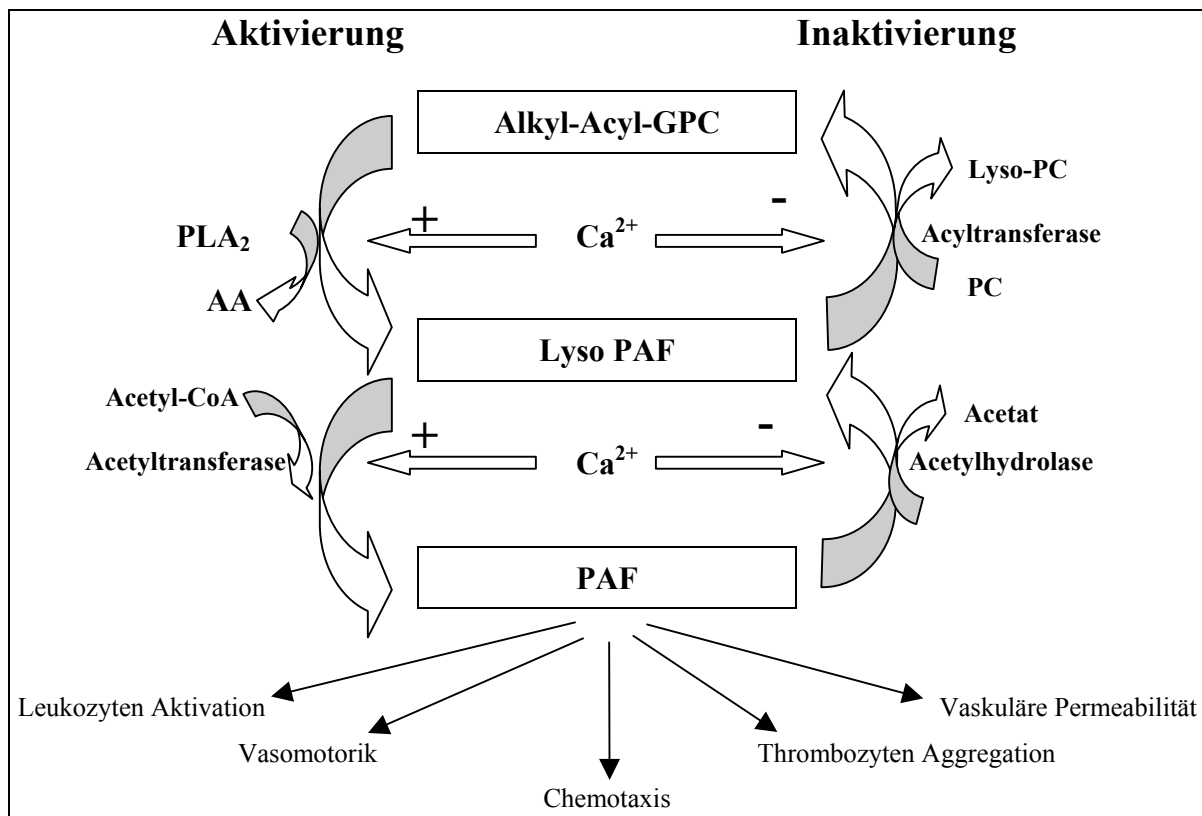


Abbildung 8

Synthese und Abbau des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF). Die linke Bildhälfte zeigt die Ca^{2+} -Ionen induzierte Aktivierung der Phospholipase A_2 (PLA_2), die zur Freisetzung von Arachidonsäure aus dem Membranphospholipid 1-alkyl-2-acyl-GPC führt. Durch den enzymatischen Einbau einer Acetylgruppe in den entstandenen Intermediaten Lyso-PAF entsteht der PAF-Acether. Die rechte Bildhälfte zeigt den PAF-Katabolismus bei sinkendem Calciumspiegel. (AA = Arachidonsäure; CoA = Coenzym A; GPC = Glycerophosphorylcholin; PAF = Plättchen-aktivierender Faktor; PC = Phosphatidylcholin), (Abb. nach Grimminger & Seeger, 1990).

Die *in vitro* Konfrontation von exogenem PAF mit Granulozyten führt zur Aktivierung zahlreicher pro-inflammatorischer zellulärer Reaktionen wie Degranulation, Plättchen-Aggregation, Sauerstoffradikalbildung und das Induzieren der Eicosanoidsynthese (Shaw et al., 1981; Smith et al., 1984). Darüber hinaus ist der Lipidmediator wie LTB_4 ein chemotaktischer Faktor, der Granulozyten zur Endotheladhäsion veranlasst und die nachfolgende Diapedese einleitet (Zimmermann et al., 1996). In niedrigen Dosen führt PAF zu einer wesentlichen Steigerung der mikrovaskulären Permeabilität (Bjork et al., 1983).

5. Fragestellung

Mit der vorliegenden Arbeit untersuchten wir unter inflammatorischen Bedingungen den Einfluß des Zytokins Interleukin 13 auf den aktivierten granulozytären Stoffwechsel. Der Zustand der Inflammation wurde in unseren Versuchsmodellen durch die Zugabe von Endotoxin gram-negativer Bakterienstämme zum Versuchspuffer herbeigeführt.

Im einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Unter welchen experimentellen Bedingungen kommt es zu einer optimalen Aktivierung der Sauerstoffradikalfreisetzung durch isolierte neutrophile Granulozyten?
2. Führt die Interaktion von IL-13 mit LPS-geprägten PMN zu einer Veränderung des „Oxidativen Bursts“?
3. Kann die pharmakologische Inhibition der Proteinkinase C die IL-13 bedingte Modulation der Sauerstoffradikalfreisetzung beeinflussen?
4. Welchen Einfluß übt IL-13 auf die Degranulationsreaktion aus?
5. Hat IL-13 einen Einfluß auf die LPS getriggerte Lipidmediatorsynthese?
6. Verändert die Inkubation von Granulozyten mit IL-13 deren inflammatorisch (LPS) induzierten PAF-Metabolismus?

II. Material und Methodik

1. Material

1.1. Pharmaka und Agenzien

- A 23 187 (Calciumionophor), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Bisindolylmaleimide, PKC-Inhibitor, Calbiochem
- Borax (Phosphoglyceroinositol), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Calciumchlorid Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Chromogenix, Substrat für Granulocyten Elastase, L-Pyroglutamyl-L-valine-p-nitroanilidin, MW 445,5, Chromogenix AB (Möhndal, Schweden)
- Cytochrome C from Horse Heart, Purity > 99%, Sigma Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)
- D-[+]-Glucose, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- EGTA Ethylenglykol tris (2-aminoethylether)-N,N-N',N'-tetraacetic acid, MW 380,4 analytic grade, Serva Feinbiochemika GmbH (Heidelberg, Deutschland)
- Endotoxin Lipopolysaccharide (LPS), from Salmonella typhimurium, Sigma (Deisenhofen, Darmstadt)
- FMLP Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (chemotaktischer Rezeptorligand) Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Hydroxytryptamine Binoxalates-1, 2-³H, NEN Life Science Products (Brüssel, Belgien)
- Interleukin 13, Recombinant Human, produced in E.coli, Biosource International (Fleurus, Belgien)
- Isotone Kochsalzlösung, Pharmacia u. Upjohn GmbH (Erlangen, Deutschland)
- Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumchlorid, KCl, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid, NaCl, Carl Roth GmbH + Co (Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3 , Merck (Darmstadt, Deutschland)

- PAF platelet activating factor (1-O-Hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Stickstoffmonoxid-Gas (1600 ppm), Messer-Griesheim (Siegen, Deutschland)
- Superoxide Dismutase from bovine Erythrocytes, Sigma Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)
- Szintillationscocktail rotiszint 2211, FLP. 49°C, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- TWEEN 20 Polyoxyethylene Sorbiton Mono-Oleate, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

1.2. Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial

- Agarose Low EEO (HSA), Paesel-Lorei GmbH u. Co (Hanau, Deutschland)
- Bottle Top Filter (0,22µm) Presterilized, Millipore Corporation (Bedford, MA, USA)
- BSA (Bovines Serum Albumin, fettsäurefrei, lyophilisiert), Paesel und Lorei (Frankfurt, Deutschland)
- Dulbecco's MEM (10×) + D-Glucose, Life Technologies GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) cum Ca²⁺/Mg²⁺, Life Technologies GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,132g/l
KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
MgCl ₂ × 6H ₂ O	0,1 g/l
NaCl	8 g/l
Na ₂ HPO ₄ × 7H ₂ O	1,15 g/l

- Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) ohne Ca²⁺/Mg²⁺, Life Technologies GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ × 7H ₂ O	1,15 g/l
NaCl	8 g/l

- EDTA-Lösung 12,5%, Ethylendinitrilotetraessigsäure-dinatriumsalz-Dihydrat; MW 372,24, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Falcon Polypropylene Conical Tubes, 50 ml, 15 ml, Becton Dickinson Lab ware (Franklin Lakes, NY, USA)

- Ficoll-Paque, Research Grade, Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
- Gelatine gepulvert, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- HEPES-Puffer, $C_8H_{18}N_2O_4S$, MW 238,31, Carl Roth GmbH u. Co (Karlsruhe, Deutschland)
- L-Glutamine (100×) 200mM, PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)
- Pasteur Capillary Pipettes, WU, (Mainz, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin (100×), 10000 Units/10mg/ml, PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)
- Petrischalen Easy Grip, 35 × 10mm, steril, Falcon, Becton Dickinson and Company (Plymouth, England)
- Pipetten 2ml, Falcon, Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NY, USA)
- Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
- Pipettenspitzen Eppendorf, Fischer (Frankfurt, Deutschland)
- Polyethylene Einmalspritzen 50ml, Becton Dickinson and Company (Plymouth, England)
- PVA, Polyvinylalkohol, $(-C_2H_4O)_n$ Merck-Schuchard (Hohenbrunn, Deutschland)
- Research Pipetten Eppendorf, 1000 μ l, 100 μ l, 10 μ l (Hamburg, Deutschland)
- RPMI Medium ohne L-Glutamin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Tris (hydroxymethyl) aminomethan, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- WRIGHTS Lösung, stabilisiert, Eosin-Methylenblaulösung für Mikroskopie, Merck (Darmstadt, Deutschland)

1.3. HPLC-Materialien und andere Lösungsmittel

- Ameisensäure 98-100% HCOOH, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ammoniaklösung 25% NH_3 , MW 17,3g/mol; Riedel-de Haen (Seelze, Deutschland)
- Bond Elut, Size 1CC, 100 MG, Varion International AG (Zug, Schweiz)
- Chloroform 95% $CHCl_3$, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Diethylether $(C_2H_5)_2O$, MW 74,12g/mol, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- DMSO Dimethylsulfoxid, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Essigsäure 100% CH_3COOH , Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Formaldehydlösung 37% HCHO, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Glutardialdehyd, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Methanol für HPLC, UV Cutoff 204nm, Burdick & Jackson, Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz)

- Natronlauge 0,1 mol/l, 0,1 N Lösung, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Salzsäure rauchend 37%, Merck (Darmstadt, Deutschland)

1.4. Authentische Standards

- ω -OH-LTB₄, Paesel und Lorei GmbH (Frankfurt/Main, Deutschland)
- LTB₄, MW 336,5, Paesel und Lorei GmbH (Frankfurt/Main, Deutschland)
- 6-trans-LTB₄, MW 336,5, Biomol Feinchemikalien GmbH (Hamburg, Deutschland)
- 6-trans-epi-LTB₄, MW 336,5, Biomol Feinchemikalien GmbH (Hamburg, Deutschland)
- 5(S), 6(R)-DiHETE, MW 336,5, Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)
- 5(S), 6(S)-DiHETE, MW 336,5, Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)
- 5-HETE, MW 320,5, Paesel und Lorei GmbH (Frankfurt/Main, Deutschland)

1.5. Lösungen für die Elastasemessung

- Substratlösung: S-2484-(Chromogenix Substrate), 1,6 mmol/l in 20% DMSO
Ansatz: 25 mg Trockensubstanz + 7 ml DMSO
zur Messung 1:4 mit aqua dest. verdünnen.
- Meßpuffer:
60 ml aqua dest.
+ 1,21g Tris = 100 mmol/l
+ 5,62g NaCl = 960 mmol/l
+ ca. 25ml 1M HCl ad pH 8,3
mit aqua dest. auf 100ml auffüllen.
- Verdünnungspuffer: 0,1M Na-Acetatpuffer, pH 5,5 mit 0,1% Tween 20:
60 ml aqua dest.
+ 1,2 ml Essigsäure 98%
+ 1M NaOH ad pH 5,5
+ 1g Tween 20
mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen.

1.6. Agenzien und Lösungen für den PAF-Bioassay

- Tyrode Gelatine ohne Ca^{2+} , pH 6,5
 - 1000 ml aqua dest.
 - + 0,195g KCl
 - + 0,211g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
 - + 8,0g NaCl
 - + 1,012g NaHCO_3
 - + 1,0g D-[+]-Glukose
 - + 0,076g EGTA
 - + 2,5g Gelatine
 - + 1M HCL ad pH 6,5
- Tyrode Gelatine mit Ca^{2+} , pH 6,5
 - wie oben, ohne Zusatz von EGTA
 - + 0,192g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- Tyrode Gelatine ohne Ca^{2+} , pH 7,2
 - wie oben
 - + 1M HCl ad pH 7,2
- Tris Tyrode mit BSA, pH 7,4
 - 1000 ml aqua dest.
 - + 0,195g KCl
 - + 0,213g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
 - + 8,0g NaCl
 - + 0,191g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 - + 1,21g Tris ultra pure
 - + 1,0g D-[+]-Glukose
 - + 2,5g Bovines Serum Albumin (BSA)
 - + 1M HCL ad pH 7,4
- [^3H]-Serotonin (Dupont NEN, Boston, MA., USA)
- Triton-X-100 (Fluka, Bern, Schweiz)

1.7. Geräte

- Biofuge A, Heraeus (Hanau, Deutschland)
- Chromatographie-Säule (25 x 0,46 cm)

-
- CO₂-Inkubator IR 1500, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
 - Delta Range PB 303 Waage, Muttler Toledo GmbH (Steinbach, Deutschland)
 - Hamilton Präzisionspritze 50µl, Hamilton (Darmstadt, Deutschland)
 - High precision Pump 300 b, Gynkotec (München, Deutschland)
 - Integrator Chromatopac C-R3A, Shimadzu (Europa) GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
 - Liquid Szintillation Analyser Typ 1900 TR, Canberra Company (Frankfurt/Main, Deutschland)
 - Mikroskop, Helmut Hund GmbH (Wetzlar, Deutschland)
 - Milli Q Wasseraufbereitungsanlage, Millipore (Eschborn, Deutschland)
 - pH-Meter Mettler Delta 320, Mettler Toledo GmbH (Halstead, England)
 - Photometer (Modell Uvicon 860), Kantron Instruments (Schweiz)
 - Pipetus-akku, Hirschmann Laborgeräte GmbH (Eberstadt, Deutschland)
 - Rheodyne-Probenaufgabeventil (Modell 7125 Syringe loading Sample Injektor)
 - Rotator CMV, Fröbel Labortechnik GmbH (Lindau, Deutschland)
 - Spektroflow 773, Absorbance Detector, BAI GmbH Bioanalytische Instrumente (Bensheim, Deutschland)
 - Sterilbank (laminar air flow) Typ BSB, 4a, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
 - Vortex Typ Reax 2000, Heidolph (Deutschland)
 - Wägezelle, Hottinger Baldwin Meßtechnik (Langen, Deutschland)
 - Wärmeschrank, Inforas AG (Bottingen, Schweiz)
 - Zählkammer nach Neubauer, Blaubrand[®], Fischer Scientific (Düsseldorf, Deutschland)
 - Zentrifuge RPC Rotanta, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

2. Methodik

2.1. Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

Humane neutrophile Granulozyten wurden aus peripherem Blut nach der Methode von Boyum (Boyum, 1976) durch eine einstufige Dichtegradientenzentrifugation und sich anschließender Sedimentation gewonnen. Die Zellisolation wurde standardisiert unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur (20-25°C) durchgeführt; die Zellisolation dauerte durchschnittlich 2 Stunden.

Blutentnahme

Für die Isolierung humaner PMN wurde EDTA-antikoaguliertes venöses Blut verwendet.

Die Blutentnahme erfolgte aus der Cubitalvene gesunder Spender mittels einer Kanüle der Größe 19G. Das Blut wurde in eine 50ml Polyethylen-Einmalspritze aspiriert, welche zuvor mit EDTA gefüllt wurde, wobei die EDTA-Endkonzentration 0,125% betrug.

Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Gradient)

Das auf diesem Wege gewonnene Blut wurde zunächst 1:2 mit einem PBS-Puffer ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (PBS-/-; Phosphate buffered Saline) verdünnt. 35 ml dieses Gemisches wurden anschließend vorsichtig mit Hilfe einer 50 ml Polypropylene-Pipette auf 15 ml vorgelegte Ficoll-Lösung in einem 50 ml fassenden Polypropylene-Röhrchen aufgeschichtet. Daran schloß sich der Dichtegradienten-Zentrifugationsschritt bei 350 x g für 35 Minuten an, in dessen Folge einzelne Banden in absteigender Reihenfolge aus thrombozytenreichem Plasma, mononukleären Zellen (Mono- und Lymphozyten), Ficoll-Lösung und einer gemeinsamen Bande aus Erythro- und Granulozyten entstanden. Durch das Absaugen der oberen drei Banden konnte die Erythro- und Granulozyten Suspension, die ein Volumen von ca. 7,5 ml umfaßte, gewonnen werden. Im weiteren Procedere führte die Aufschwemmung der Suspension mit 10%-igem Polyvinylalkohol (PVA) in NaCl (Verhältnis 1:3) und der sich daran anschließenden zehnmütigen Sedimentation der Erythrozyten zur weitgehenden Isolation der Granulozyten. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 500 x g für 10 Minuten des in neue Polypropylene-Röhrchen pipettierten Sedimentationsüberstandes erlaubte eine Reinigung vom PVA. Es folgte eine hypotone Lyse der restlichen Erythrozyten: Dazu wurde

das Zellpellet in 18 ml Aqua dest. resuspendiert und nach einer Einwirkzeit von 30 Sekunden die Lyse durch Zugabe von 2 ml 10-fachem PBS-/- Konzentrat beendet. Zur vollständigen Reinigung der PMN von Ficoll- und Erythrozyten-Rückständen folgten zwei weitere Waschschriffe in PBS-/- (500 x g; 10 Minuten).

Für die Schritte der Isolation enthielt der verwendete Puffer kein Kalzium, um eine spontane Aggregation der Zellen zu vermeiden.

Zellzählung, Identifizierung und Vitalität

Zwischen den beiden Waschschriffen erfolgte die Quantifizierung der PMN durch lichtmikroskopische Zählung mittels einer Neubauer-Zählkammer bei 400-facher Vergrößerung. Im Durchschnitt konnten aus 50 ml Blut ca. 15×10^7 PMN isoliert werden.

Zur Kontrolle der Reinheit der isolierten Granulozyten wurde in regelmäßigen Abständen ein Differentialblutbild bestimmt; der PMN-Anteil betrug hierbei 97%. Der Anteil von Mono- und Lymphozyten belief sich auf 1%, die restlichen Zellen wurden als eosinophile und basophile Granulozyten bestimmt.

Die Trypitan-Blau-Ausschluß-Methode und die LDH-Freisetzung wurden zur Bestimmung der Zellvitalität herangezogen. Am Ende des Trennverfahrens ergab sich hiermit eine Vitalität der Zellen von 98%. Die spontane LDH-Freisetzung der PMN wurde auf die durch das Bienengift Mellitin hervorgerufene absolute Enzymfreisetzung bezogen und lag immer unter 3%.

2.2. Standardprotokoll der Granulozytenversuche

Das aufnehmende Medium für die Granulozyten während der Stimulation und Inkubation war PBS +/+ , wobei die Zelldichte für die Bestimmung der verschiedenen Parameter auf unterschiedliche Werte eingestellt wurde. Für die Versuche des „respiratory burst“ sowie der Hemmung der Signaltransduktion wurde die Konzentration der Zellen auf 5×10^6 PMN/ml eingestellt. Bei der jeweiligen Bestimmung der Degranulation, der Leukotrien- und PAF-Versuche lag die Zelldichte bei 10×10^6 PMN/ml. Das Probenendvolumen pro Ansatz betrug für alle Versuche jeweils 1 ml. Für die Ermittlung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) wurde dem Versuchsmedium 0,25% bovines Serumalbumin (BSA) zur extrazellulären Stabilisierung des Mediators zugesetzt. Für einen Großteil der Versuche lieferte der 1%-ige Zusatz von autologem hitzeinaktivierten Serum zum PBS +/+ Medium das Lipopolysaccharid-binding protein (LBP). Vor der letztendlichen 10-minütigen Stimulation der Granulozyten mit Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (fmlp), bzw. Calciumionophor

A23187 im Schüttelwasserbad bei 37° C wurde die Zellreaktion durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von LPS und Interleukin 13 gestartet. Die Zellen inkubierten mit den erwähnten Substanzen unabhängig vom folgenden Analyseverfahren in einem Rotationsinkubator bei 37° C für 2 Stunden. Die Zellen wurden in der Versuchsreihe zur Hemmung der Signaltransduktion vor der finalen fmlp-Stimulation mit Bisindolylmaleimid für 10 Minuten vorinkubiert. Die Beendigung der Stimulationsperiode erfolgte entsprechend des weiteren Analyseverfahrens mittels Kühlung auf 4° C und Zentrifugation (Leukotriene, Degranulation, respiratory burst) oder durch Zugabe von 2,5ml 10mM Essigsäure in Methanol und Abkühlung auf 4° C (PAF-Analytik).

2.3. Analytik granulozytärer Funktionseinheiten

2.3.1. Degranulation

Prinzip

Im Zellüberstand erscheinende Inhaltsstoffe der verschiedenen sekretorischen Granula des Neutrophilen Granulozyten werden als Indikator einer abgelaufenen Degranulationsreaktion angesehen. Als Parameter für das Ausmaß der Degranulation wurde die Ausschüttung des proteolytischen Enzyms Elastase in den Zellüberstand herangezogen. Die enzymatische Aktivität dieses Parameters wurde kinetisch über die Umsetzung eines chromogenen Substrates photometrisch aufgezeichnet, wobei nach der publizierten Methode nach Kramps vorgegangen wurde (Kramps, 1983).

Durchführung

Entsprechend der Beschreibung wurden für die Ausführung des Assays zunächst 200µl Meßpuffer und 100µl Verdünnungspuffer in eine Küvette vorgelegt und anschließend 100µl Zellüberstand hinzugefügt. Das Einpipettieren von 200µl des Substrates L-Pyroglutamyl-L-valine-p-nitroanilidin startete dann die Extinktionszunahme, deren Geschwindigkeit mit einem Uvikon-Photometer bei 405 nm kontinuierlich über eine Zeitspanne von 4 Minuten bestimmt wurde und die Aktivität der Elastase widerspiegelte. Die Software des Photometers berechnete aus der Extinktionszunahme die Menge an Substrat, die in einer Minute in einem Volumen von einem Liter umgesetzt wurde. Die gemessene Elastase-Aktivität wird also in Unit/l angegeben. Der Substratumsatz dieses Assays wurde standardisiert bei 37°C durchgeführt.

2.3.2. Respiratorischer Burst

Prinzip

Zur Quantifizierung des respiratorischen Burstes wurde eine von Cohen (Cohen & Chovaniec, 1978) beschriebenen Methode benutzt. Sie dient der indirekten photometrischen Bestimmung des Superoxidanion Radikals als primäres Reaktionsprodukt der NADPH-Oxidase-Reaktion, wodurch die Aktivierung des respiratorischen Burstes in den Granulozyten erfaßt wird. Ausgenutzt wird die photometrisch meßbare Reduktion von Cytochrom C durch das von den stimulierten Zellen ausgeschüttete Superoxidanion Radikal. Die Kurzlebigkeit der Sauerstoff-Radikale machte es notwendig, das Cytochrom C schon vor Stimulation den Versuchsansätzen zu zusetzen, damit das entstandene O^{2-} sofort mit dem Substrat reagieren konnte. Den für jede einzelne Bestimmung angefertigten Parallelansätzen wurde zusätzlich das Enzym Superoxiddismutase (SOD) hinzugegeben, welches das entstandene Superoxidanion Radikal rasch in weniger reaktive Produkte disproportionierte und somit die O^{2-} abhängige Cytochrom C Reduktion verhinderte. Nur die Differenz in der Extinktion beider Ansätze, welche den SOD hemmbaren Anteil der Cytochrom C-Reduktion anzeigt, wurde dem ausgeschütteten O^{2-} zugeschrieben.

Durchführung

Die paarig angelegten Versuchsansätze wurden kurz vor der Stimulation mit 75 μ M Cytochrom C versetzt, wobei einer Probe des Paares 10 μ g/ml SOD hinzugegeben wurde. Nach Stimulusapplikation erfolgte eine 10-minütige Inkubation im 37°C warmen Wasserbad, bis die Zellreaktion durch Abkühlung der Ansätze auf Eis und anschließender Zentrifugation bei 4°C (13000 U/min, 2 min) beendet wurde. Nach dem Überpipettieren der Zellüberstände in Küvetten erfolgte die photometrische Bestimmung der Cytochrom C-Reduktion bei 546nm, wobei jeweils die Extinktionsdifferenz der Paaransätze bestimmt wurde. Die granulozytäre O^{2-} Produktion konnte aufgrund der 1:1 Stöchiometrie der Reaktion unter Annahme eines Extinktions-Koeffizienten von 21 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ berechnet werden.

2.4. Analytik der Arachidonsäure-Metabolite

Der Nachweis der Arachidonsäure-Metabolite erfolgte durch Reinigung, Auftrennung, Identifizierung und Quantifizierung mittels einer Sequenz von Festphasenextraktion und Reversed-Phase-HPLC-Analytik.

2.4.1. Festphasenextraktion

Aus Granulozyten-Versuchen gewonnene Zellüberstände von 0,9 ml Volumen wurden für 24 Stunden nach deren Abnahme bei -20°C tiefgefroren und nach dem Auftauen der Vorsäulenextraktion zugeführt. Dieser erste Schritt in der Nachweiskette der Arachidonsäure-Metabolite diente der Anreicherung und Reinigung der zu chromatographierenden Arachidonsäurederivate. Das hierzu verwendete Material waren 1 cm^3 Vorsäulen (Bond Elut) aus einer Silica-Gel Matrix mit einer Partikelgröße von $40\mu\text{m}$, die kovalent mit gesättigten C_{18} -Alkylresten verbunden war. Durch die hohe Affinität der unpolaren Lipoxygenase-Metaboliten zur stationären apolaren Silica-Gel Matrix gelang die Bindung der Leukotriene und HETEs aus dem Zellüberstand an die C_{18} -Alkylresten. Durch die Zugabe des unpolaren Lösungsmittels Methanol konnten die gebundenen Substanzen eluiert und aufgefangen werden. Für die Schritte der Extraktion und Elution wurden ausschließlich, wegen der Temperaturempfindlichkeit der Molekülstrukturen, eisgekühlte Lösungen und zusätzlich zur Beschleunigung des Verfahrens eine an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene Vakuumkammer verwendet. Dieses Verfahren wurde in seinen einzelnen Schritten wie folgt ausgeführt: Im ersten Schritt erfolgte die Konditionierung der Säulen durch das zweimalige Spülen mit jeweils 1 ml Methanol und Aqua dest.. Darauf folgend wurden die gewonnenen und eisgekühlten Zellüberstände auf die Säulen gegeben und liefen ohne Unterdruck über einen ungefähren Zeitraum von 3 Minuten durch. Zur weiteren Abtrennung von polaren Verunreinigungen der Zellüberstände erfolgte eine zweimalige Waschung der Säulen mit Aqua dest. im Unterdruck. Durch das Aufpipettieren von $100\mu\text{l}$ Chloroform und dessen rasches Absaugen wurde die Matrix von der wässrigen Phase vollständig befreit. Schließlich erfolgte die Elution der Arachidonsäure-Metabolite durch die Zugabe von $250\mu\text{l}$ Methanol. Diese Menge wurde nach einer einminütigen Einwirkzeit zunächst nur unvollständig und nach einer weiteren Minute Wartezeit vollständig in Eppendorfgefäße abgesaugt. Die so gewonnenen Proben wurden unter ständigem Stickstoffstrom eingedampft und bis zu deren Chromatographie bei -20°C aufbewahrt. Die Recoverydaten, welche mit der folgenden

Methode erreicht wurden, ergeben sich für die Anreicherung der Arachidonsäure-Metabolite wie folgt (Mittelwert +/- Standardabweichung in Prozent aus 5 unabhängigen Recoveryexperimenten):

Arachidonsäure-Derivate:

○ LTB ₄	34,5 +/- 3,0
○ Omega-OH-LTB ₄	43 +/- 5,4
○ 6-trans-LTB ₄	44 +/- 0,6
○ 6-trans-epi-LTB ₄	45 +/- 0,5
○ 5,6-DiHETE	40 +/- 0,6
○ 5,6-epi-DiHETE	35 +/- 0,5
○ 5-HETE	28,5 +/- 2,9

2.4.2. HPLC-Analyseverfahren

Fabrikation und Konditionierung der HPLC-Säule

Bausteine der stationären Phase waren zum einen eine 25 cm lange Edelstahl-Leersäule mit einem Innendurchmesser von 0,46 cm und zum anderen das Packungsmaterial aus Octadecysilyl-Hypersil-5 μ -Partikeln. Zur Füllung der zuvor mit Methanol und Aceton gereinigten Säule wurden zunächst 3,8g der Trockensubstanz in 35 ml Isopropanol in einem Glasbehälter gelöst. Es folgte die 5-minütige Behandlung der Suspension in einem Ultraschallbad, bevor sie in den Vorratsbehälter eines Säulenpackgerätes (Knaur) gefüllt wurde, um mit diesem unter einem Druck von 440 bar maschinell mit einem Methanolstrom in die einseitig verschlossene Säule eingeflutet zu werden. Es schloß sich eine Ergänzung der so hergestellten und nun verschlossenen Hauptsäule mit einer 3,3 cm langen Vorsäule an. Diese diente dem Schutz der Hauptsäule vor Verunreinigungen. Die fertiggestellte Säule wurde dann vor Inbetriebnahme mit einem Gemisch aus Methanol und Aqua dest. im Verhältnis 1:9 sowie einem 0,5%-igem Na₂-EDTA-Zusatz konditioniert.

Ansetzen der mobilen Phase

Die Bestandteile der mobilen Phase waren Methanol / Aqua dest. / Essigsäure im Volumenverhältnis 72 / 28 / 0,16 und wurden mit 10% NH₄OH auf einen pH-Wert von 4,9 eingestellt. Vor Gebrauch wurde dieses Gemisch zur Entfernung von partikulären Verunreinigungen mit Hilfe eines Ganzglas-HPLC-Filtersystems (Schott) mit einem Unterdruck von 700 mbar durch eine Teflonmembran gesogen.

Reversed-Phase-HPLC (isokratisch)

Es wurde ein Trennverfahren angewandt, welches erstmals von Mathews (Mathews et al., 1981) beschrieben wurde und für diese Arbeit in leicht abgewandelter Form zum Einsatz kam. Die für dieses Verfahrensweise zusammengestellte Anlage setzte sich aus den folgenden technischen Bauteilen zusammen:

1. Gynkotek M 600 Pumpe
2. Rheodyne-Probenaufgabeventil
3. Spektroflow 773 UV-Detektor
4. Shimadzu-Integrator

Der Ablauf der Auftrennung und Quantifizierung sah wie folgt aus:

Die aus der Vorsäulen-Analytik gewonnenen Proben wurden mit einem definierten Methanol Volumen von 50 μ l aufgenommen und mit einem Rüttler gemischt, damit sich an den Wänden des Gefäßes haftende Probebestandteile vollständig lösen konnten. Zur Aufgabe auf die Chromatographie-Säule diente eine Hamilton-Spritze, die vor Gebrauch mehrfach mit Methanol gespült wurde. Nach dem Aufziehen eines Methanolkissens (5 μ l) wurden 20 μ l der zuvor kurz zentrifugierten Probe ebenfalls aufgenommen und über das Probenaufgabeventil auf die Säule gebracht. Die Auftrennung der Leukotriene erfolgte nun unter einem konstanten Fluß der mobilen Phase von 1,3 ml pro Minute bei einem Druck von ungefähr 180 bar. Mit dieser Technik konnten sehr gut das durch die LTA₄-Hydrolase synthetisierte LTB₄, die spontanen LTA₄-Zerfallsprodukte 6-trans-LTB₄, 6-trans-epi-LTB₄, 5,6-di-HETE, 5,6-epi-di HETE, sowie das 5-HETE dargestellt werden, wohingegen die LTB₄-Abbauprodukte ω -OH-LTB₄ und ω -COOH-LTB₄ in dem breiten Lösungsmittelpeak der Chromatogrammfront koeluierten. Die UV-spektrometrische Detektion der Leukotriene erfolgte in einem 20-minütigen Zeitraum bei einer Wellenlänge von 270 nm, während für die Analyse des 5-HETEs nach diesem Intervall die Wellenlänge auf 237 nm umgestellt werden mußte. Da die Arachidonsäure-Derivate unterschiedliche innermolekulare Ladungsverteilungen aufweisen, unterscheiden sie sich hinsichtlich ihres Affinitätsverhaltens gegenüber der stationären Phase und somit auch in ihren Retentionszeiten. Der Vergleich der Retentionszeiten mit den Retentionszeiten isolierter Standards ließ somit eine Identifizierung der erhaltenen Peaks und damit der Derivate zu. Die Retentionszeiten der isolierten Standards wurden vor Analysebeginn und dann immer wieder regelmäßig bestimmt. Der zur technischen Einheit gehörende Shimadzu-Integrator bestimmte die Höhe der eluierten Derivate, die dann mit Hilfe von ermittelten Response- und Recoverydaten in ng/ml umgerechnet werden konnte.

2.5. Analytik des Plättchen-aktivierenden Faktors

Für die Analyse des Plättchen-aktivierenden-Faktors (PAF) wurde ein zweistufiges Verfahren angewandt, bei dem zum einen die Lipide extrahiert wurden und zum anderen die biologische Aktivität von PAF gegenüber isolierten Kaninchen-thrombozyten ausgenutzt wurde (Bioassay). Detektiert wurde hierbei die PAF-induzierte [³H]-Serotonin-Freisetzung aus zuvor mit eben dieser Substanz vorinkubierten Kaninchenplättchen. Die Granulozyten selbst durchliefen vor Ausführung des Assays eine Lipidextraktion, bei der sowohl der zellgebundene als auch der freie PAF gewonnen werden konnte. Die Vorgehensweise ist im einzelnen wie folgt beschrieben:

2.5.1. Lipidextraktion

Bligh und Dyer beschrieben ein Extraktionsverfahren (Bligh & Dyer, 1953), bei dem Lipide gleichzeitig aus Zellen und deren Überstände herausgearbeitet werden konnten, womit die Erfassung der PAF-Gesamtproduktion, also des freien und zellgebundenen Lipidmediators gelang. Die Anwendung dieses Verfahrens geschah in leicht modifizierter Form. Nach Stimulation der Granulozyten für 10 Minuten mit Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (fmpl) wurde die Zellreaktion durch das Zupipettieren von 2 ml eisgekühltem Methanol und 500µl 50mM Essigsäure in Methanol sowie der Lagerung auf Eis abgestoppt. Im nächsten Schritt erfolgte die zweimalige Zugabe von 750 µl Chloroform, auf die jedes Mal ein kräftiges Rütteln der Proben und ein 15minütiges Lagern auf Eis folgte. Das Trennen in eine wässrige und lipophile Phase erfolgte dann durch die Zugabe von 750 µl 0,1mM Natrium-Acetat. Es folgte eine kurze Zentrifugation (400 x g, 2 min), nach welcher der wässrige Überstand abgenommen und verworfen wurde. Von einer Waschlösung aus Methanol und 0,1 M Natriumacetat im Verhältnis 10:9 wurden anschließend jeweils 3 mal 1 ml zu den Proben hinzugegeben und nach intensivem Aufrütteln immer wieder abpipettiert. Dies führte zu einer weiteren Reinigung der Chloroformphase, welche die extrahierten Lipide enthielt und im Anschluss daran abgesaugt und in Eppendorf-Cups übertragen werden konnte. Die Lagerung der so extrahierten Lipide erfolgte bei -20°C. Für den Einsatz im Bioassay mußten sie kurz zuvor unter ständigem Stickstoffstrom eingedampft und danach in 60 µl BSA-Tyrode aufgenommen werden.

2.5.2. PAF-Bioassay

Das Verfahren des PAF-Bioassays wurde erstmals 1979 von Pinckard beschrieben (Pinckard et al., 1979). Aufgrund der dosisabhängigen biologischen Aktivität des PAF gegenüber

Kaninchenthrombozyten erlaubte dieses Verfahren sowohl eine indirekte Identifizierung als auch eine Quantifizierung des Mediators im Zellextrakt. Gemessen wurde die PAF-ausgelöste Freisetzung von [³H]-Serotonin aus entsprechend vorinkubierten Kaninchenthrombozyten.

Gewinnung und Markierung der Kaninchenthrombozyten

Kaninchen der Firma Behring wurde nach Einleitung einer Rompun-Kurzarkose die zentrale Ohrarterie mittels einer Kanüle der Größe 25 g punktiert und 25-30 ml Blut entnommen, welches mit EDTA in einer Endkonzentration von 0,125% versetzt wurde. Eine 20minütige Zentrifugation des Blutes bei 375 x g führte zur Trennung dessen Bestandteile und es konnte das thrombozytenreiche Plasma abgenommen werden. Dieses Plasma wurde dann mit [³H]-Serotonin (2,5 µCi/ml Plasma) zur Markierung der Thrombozyten für eine Stunde unter wiederholtem Schwenken des Ansatzes bei 37°C und 5% CO₂-Begasung im Wärmeschrank inkubiert. Nach dem Verlauf der Stunde konnte durch Zentrifugation (1400 x g, 10 min) ein thrombozytenreiches Pellet gewonnen werden, welches noch dreimal mit calciumfreier Tyrode (pH 6,5) resuspendiert und zentrifugiert wurde.

Durchführung des Analyseverfahrens

Nach dreimaligem Waschen der Thrombozyten konnten diese in calciumhaltiger Tyrode (pH 6,5) aufgenommen und auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/µl eingestellt werden. Für den Versuchsablauf gab es pro Stimulation mit dem aus den Granulozytenversuchen extrahierten PAF zwei Ansätze. Im Ersten wurden 400 µl Tyrode (pH 7,2) vorgelegt, 100 µl der Thrombozytensuspension hinzupipettiert und anschließend die Serotoninfreisetzung durch die Zugabe von 50 µl in BSA-Tyrode aufgenommenem Granulozytenextrakt gestartet. Nach 60 Sekunden wurden hieraus 200 µl abgenommen und in den zweiten mit 20 µl 1,5 mM Formaldehyd-Lösung versehenen Ansatz gegeben, was zur Stabilisierung der Thrombozyten führte und somit die [³H]-Serotonin-Ausschüttung beendete. Der Zellüberstand mit dem in ihm enthaltenen radioaktiv markierten Serotonin konnte nach Abzentrifugation der Thrombozyten mit 10 ml Scintillator versetzt und die β-Strahlung des [³H]-Serotonins im β-Counter detektiert werden. Zur Umrechnung der counts in absolute Mengenangaben wurde eine Standardreihe angelegt, bei der in einer Zweifachbestimmung Thrombozyten mit exogenem PAF in Konzentrationen von 10^{-5} M bis 10^{-13} M stimuliert wurden. Nach dem Auftragen der Standardkurve in einem Koordinatensystem konnte die PAF-Konzentration der Proben graphisch ermittelt werden.

2.5.3. Statistik

Zum statistischen Vergleich wurde eine Anova (Analysis of Variance) durchgeführt. Ein Niveau von $p < 0,05$ wurde als signifikant bezeichnet. Die Analysen wurden mit SPSS für Windows[®] durchgeführt.

III. Ergebnisse

1. Interleukin 13 steigert tendenziell die LPS-ausgelöste Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Neutrophilen Granulozyten

Interleukin 13 führt zu einer tendenzielle Steigerung der von LPS ausgelösten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Darüber hinaus hängt das Ausmaß der Reaktion sehr stark von dem Zusatz autologen Serums im Inkubationspuffer ab.

Zunächst wurde in Vorversuchen die optimale LPS-Inkubationszeit und Dosis sowie der optimale Stimulus für die Ausschüttung der reaktiven Sauerstoffspezies bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an LPS für ein bis drei Stunden vorinkubiert und anschließend mit 1µM A23187 oder 0,1µM fmlp stimuliert. Die gewählten Konzentrationen von A23187 und fmlp entsprachen den üblichen für die Stimulation von Granulozyten in der Literatur angegebenen Konzentrationen (Casimir & Teahan, 1994). Wahlweise wurde dem Puffer während der Vorinkubation 1% autologes hitzeinaktiviertes Serum zugesetzt. Im Anschluss an die Stimulation erfolgte eine photometrische Bestimmung der Superoxidation Radikal Freisetzung. Die Auslösung der Zellreaktion mit A23187 stellte sich als ungeeignet dar und konnte weder durch höhere LPS-Dosen noch durch die Zugabe von Serum zum Inkubationspuffer in ihrem Umfang wesentlich beeinflusst werden. Die mit diesem Stimulus erreichten Maximalwerte lagen weit unter denen, die mit fmlp-Stimulation erreicht werden konnten. Die fmlp getriggerte Sauerstoffradikal-Freisetzung hingegen zeigte einen deutlichen LPS-Priming-Erfolg, d.h. der Umfang der Ausschüttung stieg mit Zunahme der LPS-Konzentration (10ng - 1000ng/ml). Die für die Versuche ausgewählte mittlere Inkubationszeit von 2 Stunden schien am geeignetsten und wurde für alle anderen Versuche beibehalten. Der Zusatz von Serum zum Inkubationsmedium führte zu einer deutlichen Verstärkung des LPS-Priming-Erfolges (Abb.9) und konnte diesen maximal um den Faktor 5,1 steigern, wobei nur LPS-Konzentrationen bis 100ng/ml benutzt wurden. Nachdem das LPS-Priming und dessen Steigerung durch die Zugabe von Serum gelungen war, sollte der Einfluß von IL-13 auf das LPS-Priming untersucht werden. Dazu wurden die Zellen zunächst ohne den Zusatz von Serum zum Puffer gleichzeitig mit IL-13 (0,1ng – 10ng/ml) und LPS (10ng - 1000ng/ml) für 2h inkubiert. Es zeigte sich, daß IL-13 in steigender Konzentration die LPS-Priming-Antwort verstärkt (Abb.10), jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte. Dies wiederholte sich regelmäßig in allen Versuchen. Im nächsten Schritt erfolgte der 1%-ige Zusatz von Serum zum Puffer und dann die erneute gleichzeitige Inkubation für 2 Stunden

mit IL-13 (0,1ng – 10ng/ml) und LPS (10ng, 100ng/ml). Der gemessene Umfang der Superoxidanion Radikal Produktion lag in der Höhe, die auch schon zuvor nach dem Zusatz von Serum bestimmt wurde. Zusätzlich zeigte sich wieder die Tendenz der LPS-Priming verstärkenden Wirkung von IL-13 (Abb.11) ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Die in Vorversuchen ermittelte Inkubationszeit von 2 Stunden sowie die Konzentrationen von IL-13, LPS und der Zusatz von autologem hitzeinaktivierten Serum zum Versuchspuffer wurden, wenn nicht anderweitig beschrieben, für alle weiteren experimentellen Ansätze beibehalten.

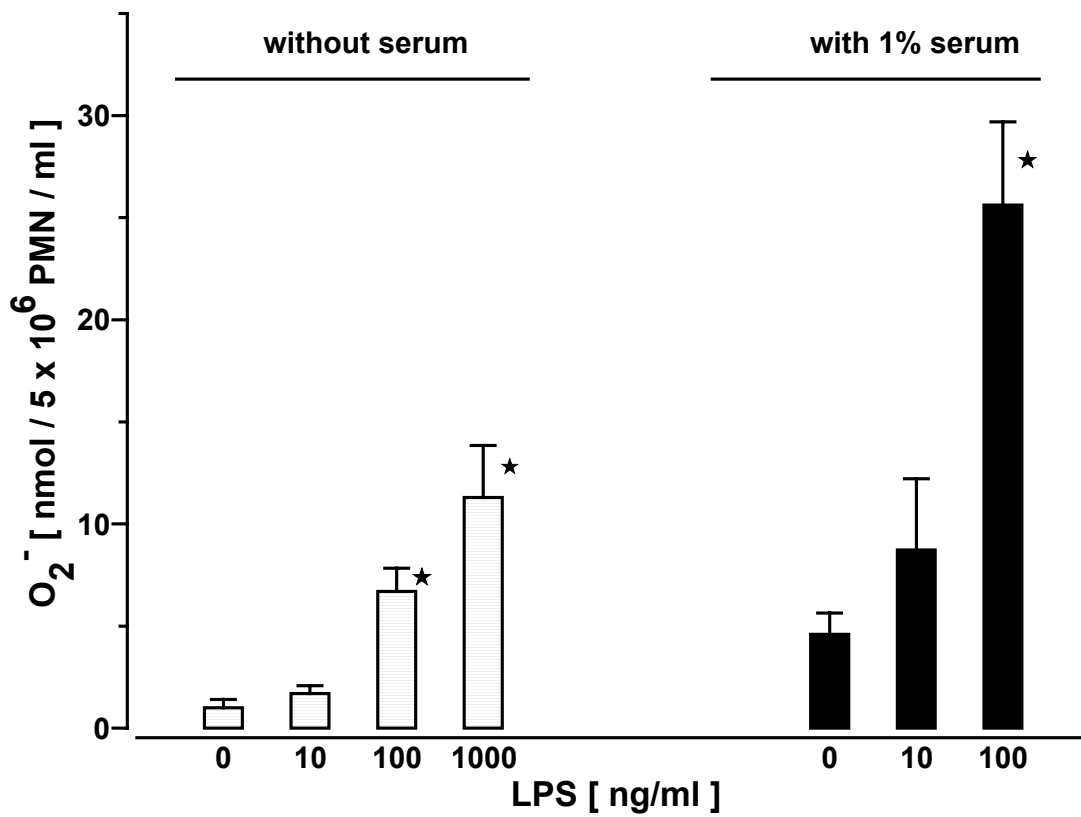


Abbildung 9

5×10^6 PMN / ml wurden für 2 Stunden mit steigenden LPS-Konzentrationen und 1% -igem Zusatz von autologem hitzeinaktiviertem Serum zum Versuchspuffer (schwarze Säulen), bzw. ohne Serumzusatz (graue Säulen) inkubiert und anschließend mit $0,1 \mu\text{M}$ fmlp stimuliert. Die Produktion von Superoxidanion Radikal ist in $\text{nmol } O_2^- / 5 \times 10^6 \text{ PMN / ml}$ angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\pm SEM) aus 4 unabhängigen Experimenten. [★ = $p < 0,05$ vs. 0 ng/ml LPS].

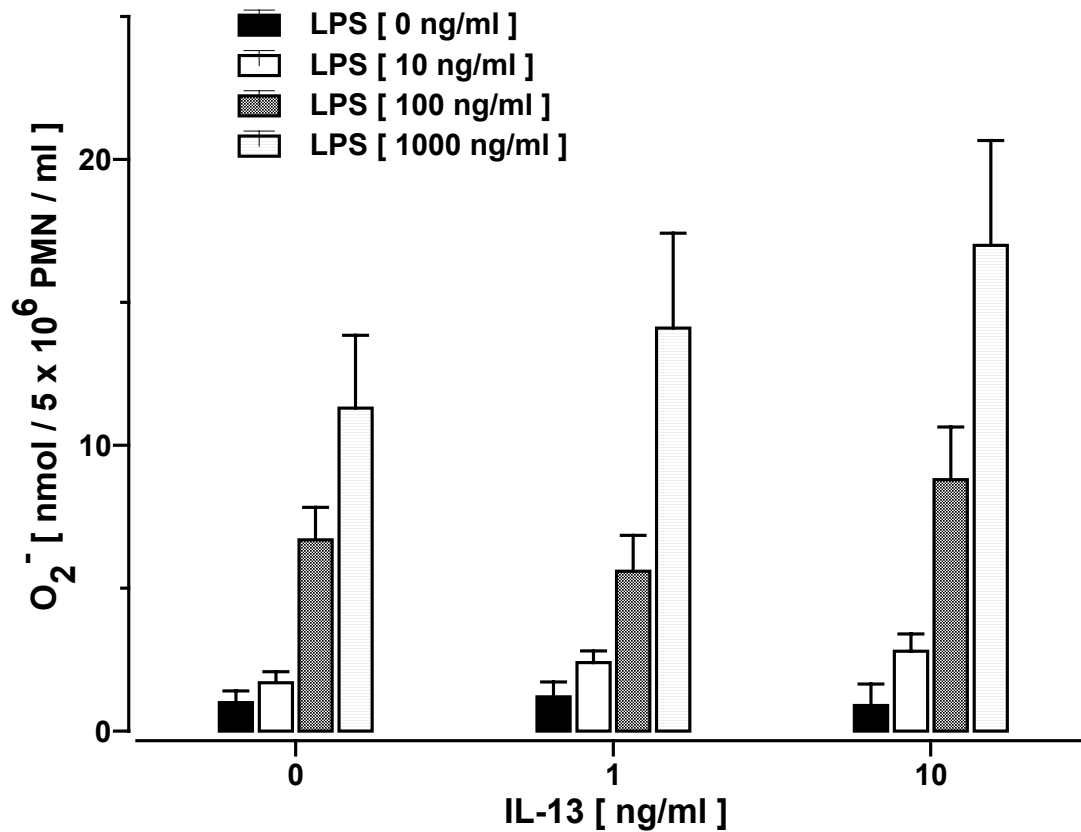


Abbildung 10

5×10^6 PMN / ml wurden gleichzeitig für 2 Stunden mit IL-13 (0,1ng – 10ng/ml) und LPS (10ng - 1000ng/ml) inkubiert und anschließend mit $0,1 \mu\text{M}$ fmlp stimuliert. Dargestellt sind nur die Ergebnisse der IL-13 Konzentrationen (0ng, 1ng, 10ng/ml). Die Produktion von Superoxidanion Radikal ist in nmol O_2^- / 5×10^6 PMN / ml angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\pm SEM) aus 4 unabhängigen Experimenten.

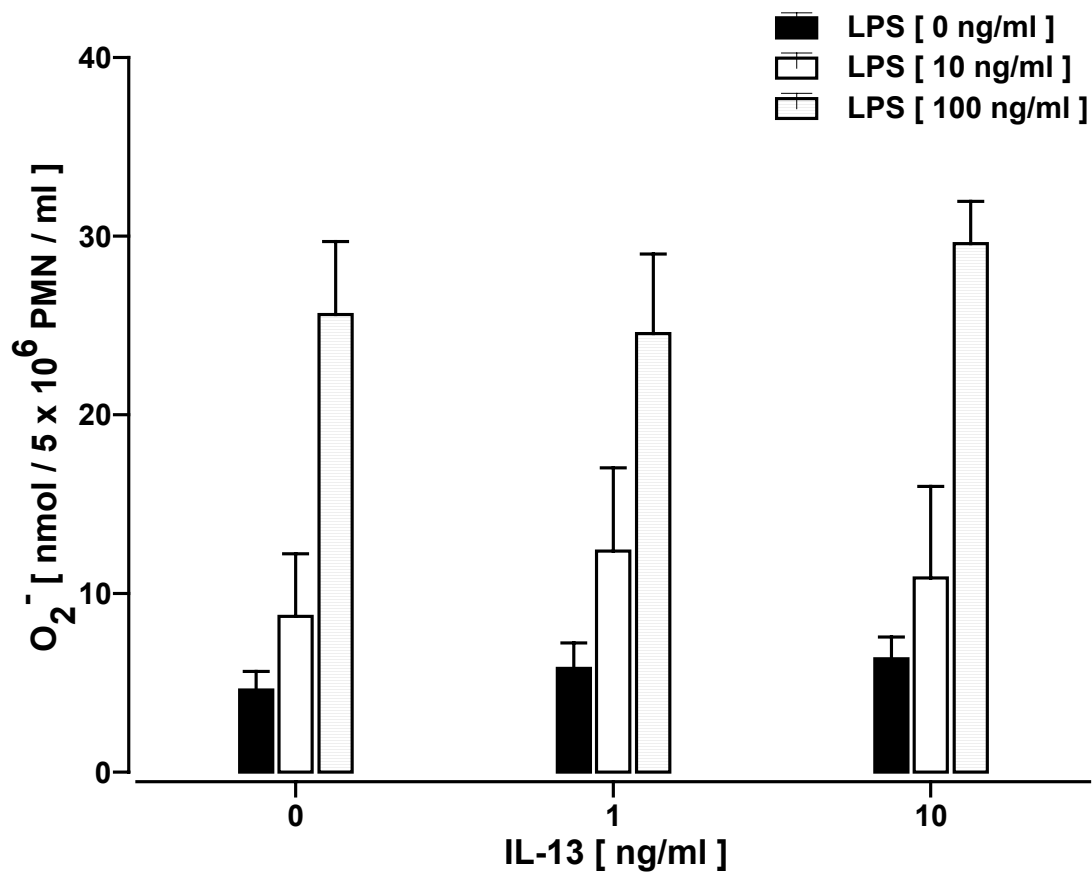


Abbildung 11

5×10^6 PMN / ml wurden gleichzeitig für 2 Stunden mit IL-13 (0,1ng – 10ng/ml), LPS (10ng, 100ng/ml) und einem 1% -igen Zusatz von autologem hitzeinaktivierten Serum zum Versuchspuffer inkubiert und anschließend mit $0,1 \mu M$ fmlp stimuliert. Hier aufgezeigt sind nur die Ergebnisse der IL-13 Konzentrationen (0ng, 1ng, 10ng/ml). Die Produktion von Superoxidanion Radikal ist in $nmol O_2^- / 5 \times 10^6$ PMN / ml angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\pm SEM) aus 4 unabhängigen Experimenten.

2. Interleukin 13 führt zur vermehrten Aktivierung von Proteinkinase C (PKC)

Die Inkubation von PMN mit IL-13 führt zu einer Steigerung der von LPS ausgelösten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Der Einsatz des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimide zeigt eine generelle Hemmung des Oxidativen Burstes, die ohne zusätzliche IL-13 Inkubation stärker verläuft.

Für dieses Experiment wurden drei Versuchsreihen angelegt, von denen die eine mit LPS (10ng/ml), die andere zusätzlich mit IL-13 (1ng/ml) für 2 Stunden vorinkubiert wurde und eine dritte ohne die Zugabe von Stimuli als Kontrolle diente. Nach der abgelaufenen Inkubationszeit erfolgte die Konfrontation der Zellen mit Bisindolylmaleimide (0,5µM-10µM/ml) für 10 Minuten und die anschließende Stimulation der Zellen mit 0,1µM fmlp. Die photometrische Bestimmung zeigte wieder die schon vorher beobachtete Steigerung der von LPS ausgelösten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch IL-13. Des Weiteren war eine deutliche Hemmung bis zur Aufhebung des Oxidativen Burstes in allen drei Versuchsreihen durch die Zugabe von Bisindolylmaleimide zu beobachten (Abb.12). In einer weiteren Graphik erfolgt die ausschnittsweise Darstellung der gewonnenen Kurven, an denen die jeweilig benötigte inhibitorische Konzentration des PKC-Inhibitors von 50% (IC_{50}) aufgetragen wurde, welche zuvor graphisch ermittelt wurde (Abb.13). In der Versuchsreihe der simultanen Inkubation mit LPS und IL-13 wird eine inhibitorische Konzentration von 1,46µM Bisindolylmaleimide benötigt, wohingegen in der Versuchsreihe mit alleiniger LPS Inkubation eine hemmende Konzentration von 1,22 µM Bisindolylmaleimide ausreichend ist, um die Sauerstoffradikal-Ausschüttung auf 50% ihres Maximums zu reduzieren. Weit weniger wurde in der Kontrollreihe benötigt.

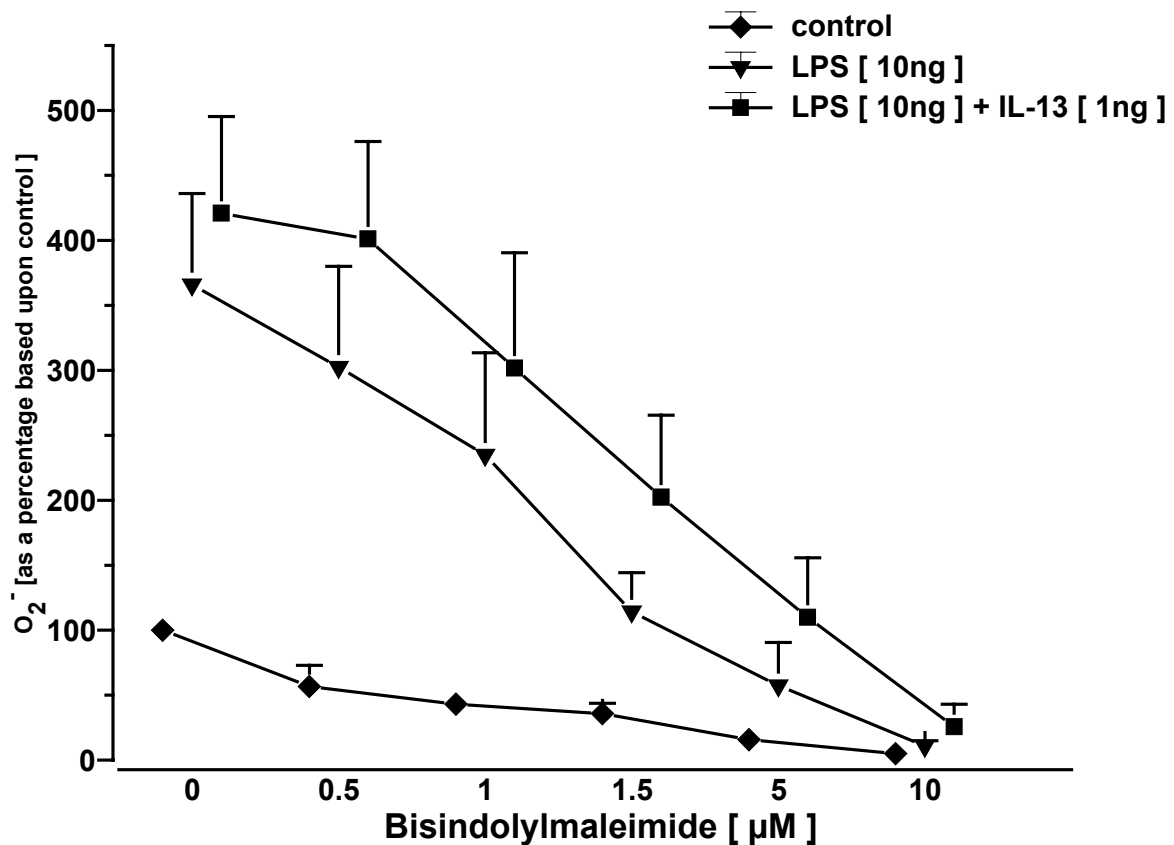


Abbildung 12

5×10^6 PMN / ml wurden in drei unterschiedlichen Versuchsreihen einmal gleichzeitig mit IL-13 (1ng/ml) und LPS (10ng/ml), einmal nur mit LPS (10ng/ml) und als Kontrollgruppe ohne Stimuli für 2 Stunden in einem Puffer mit 1% -igem Zusatz von autologem hitzeinaktiviertem Serum inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Konfrontation der Zellen mit Bisindolylmaleimide (0,5 μM -10 μM /ml) und eine folgende Stimulation mit 0,1 μM fmlp. Es zeigt sich eine deutliche Hemmung der Sauerstoffradikal-Produktion in allen drei Versuchsreihen bei zunehmender Konzentration des Inhibitors. Die Produktion von Superoxidanion Radikal ist prozentual in Bezug auf den Nullwert der Kontrollreihe angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\pm SEM) aus 7 unabhängigen Experimenten. Wo kein SEM angegeben ist, fällt sie mit dem Symbol der jeweiligen Reihe zusammen.

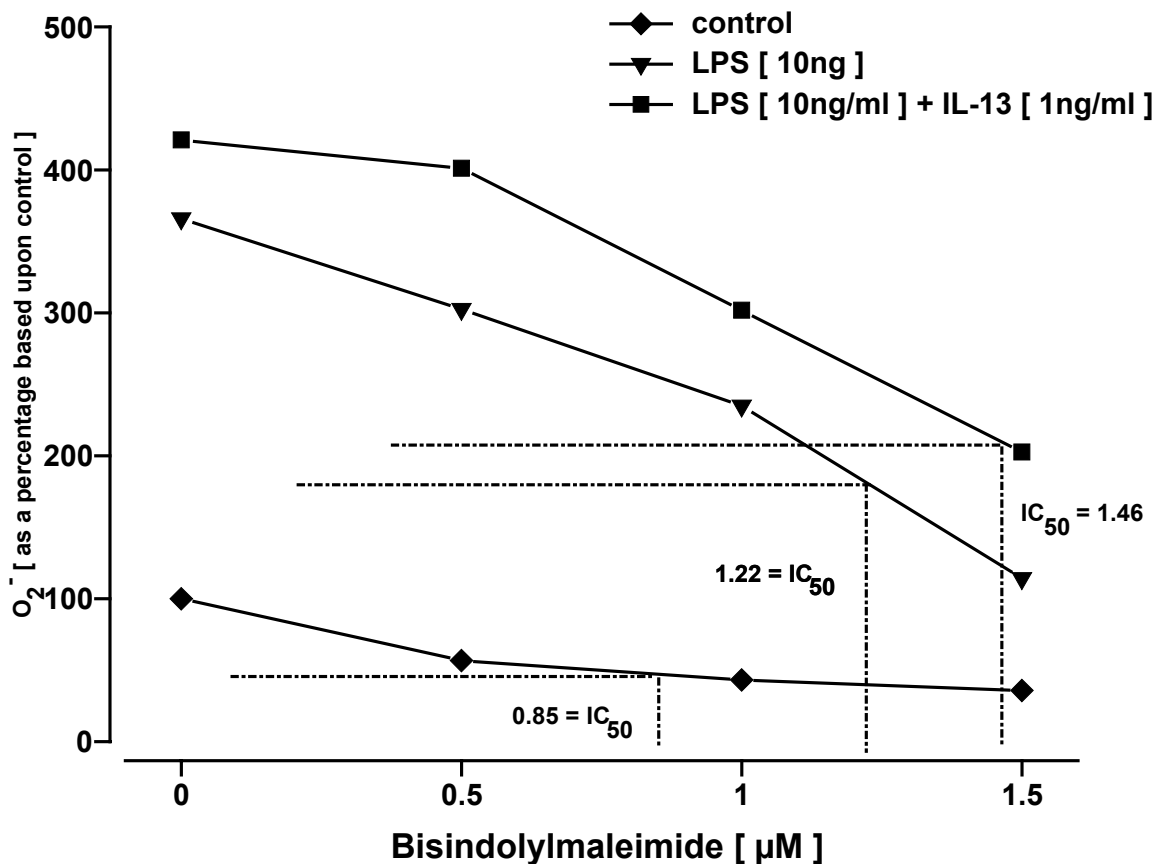


Abbildung 13

Zeigt einen Ausschnitt aus den Kurvenverläufen von Abb.12, in den die IC₅₀ Konzentrationen des Proteinkinase C (PKC) Inhibitors Bisindolylmaleimide eingetragen wurden. Zur Ermittlung der IC₅₀ Konzentrationen wurde der photometrisch gemessene Wert der Kontrollreihe bei Einsatz des Inhibitors in einer Konzentration von 10μM/ml als tiefster zu inhibierender Wert bestimmt. Dieser Wert wurde dann von den Maxima der anderen Versuchsreihen subtrahiert, was somit zur Darstellung des Inhibitionsumfangs der jeweiligen Reihe führte. Nach der Errechnung des 50 Prozent Hemmungswertes wurde dieser graphisch auf die X-Achse projiziert und so die zugehörige Hemmkonzentration von Bisindolylmaleimide bestimmt. Es zeigt sich deutlich, daß Bisindolylmaleimide in einer höheren Konzentration in der IL-13-LPS-Reihe als in der reinen LPS-Reihe eingesetzt werden muß, um eine 50%-ige Inhibition zu erreichen.

3. Hemmung der LPS getriggerten Degranulationsreaktion von Neutrophilen Granulozyten durch Interleukin 13

Interleukin 13 führt in Abhängigkeit seiner Konzentration im Versuchspuffer zu einer Hemmung der LPS-geprimten Elastaseausschüttung.

Vorversuche, in denen Neutrophile Granulozyten für 2 Stunden mit LPS in ansteigenden Konzentrationen inkubiert wurden, um anschließend mit 0,1 μ M fmlp oder 1 μ M A23187 stimuliert zu werden, haben gezeigt, daß sich die Degranulationsreaktion der Granulozyten mit fmlp nur unzureichend, bzw. gar nicht auslösen läßt. Hingegen zeigte sich nach A23187 Stimulation eine gute photometrisch bestimmbare Substratumsetzung, welche indirekt eine Elastase-Ausschüttung beweist und einen deutlichen LPS-Priming-Erfolg zeigte. Die PMN der folgenden Versuche wurden gleichzeitig mit IL-13 (0,1ng – 10ng/ml) und LPS (10ng, 100ng/ml) inkubiert. Nach der Stimulation der PMN mit A23187 konnte besonders in der 100ng LPS-Reihe für die mittlere IL-13 Konzentration (1ng/ml) eine Hemmung des “LPS-Primings“ beobachtet werden, welche bei höheren IL-13 Konzentrationen wieder verschwand (Abb.14). Zusätzlich ist in Abb.14 die Kontrollreihe ohne LPS-Zusatz dargestellt sowie die Reihe mit 10ng/ml LPS-Zusatz.

In der Reihe ohne LPS-Zusatz sowie in der 10ng LPS-Reihe konnte durch die Inkubation der PMN mit IL-13 keine signifikante Veränderung der Elastase-Ausschüttung erreicht werden.

Da unter anderem die 5-Lipoxygenase-Metabolite wie LTB₄ und 5-HETE über auto- und parakrine Mechanismen einen umfangreichen Einfluß auf das Reiz-Antwort-Verhalten der Granulozyten ausüben, sollte in einer folgenden Versuchsreihe deren Auswirkung auf die durch LPS und IL-13 geprimte Degranulationsreaktion untersucht werden. Dazu wurden die Zellen unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben gleichzeitig mit LPS und IL-13 inkubiert. Bei der anschließenden Stimulation mit A23187 wurden simultan zur Stimulusgabe 10 μ M AA/ml der Suspension zugesetzt. In weiter unten beschriebenen Versuchen führte die Zugabe von 10 μ M AA zu einer Steigerung der Leukotriensynthese. Die nach Stimulation gemessenen Elastase-Werte waren in ihrem Umfang zwar gesteigert, es konnten jedoch im Hinblick auf die gleichzeitige Inkubation mit IL-13 keine weiteren Informationen gewonnen werden.

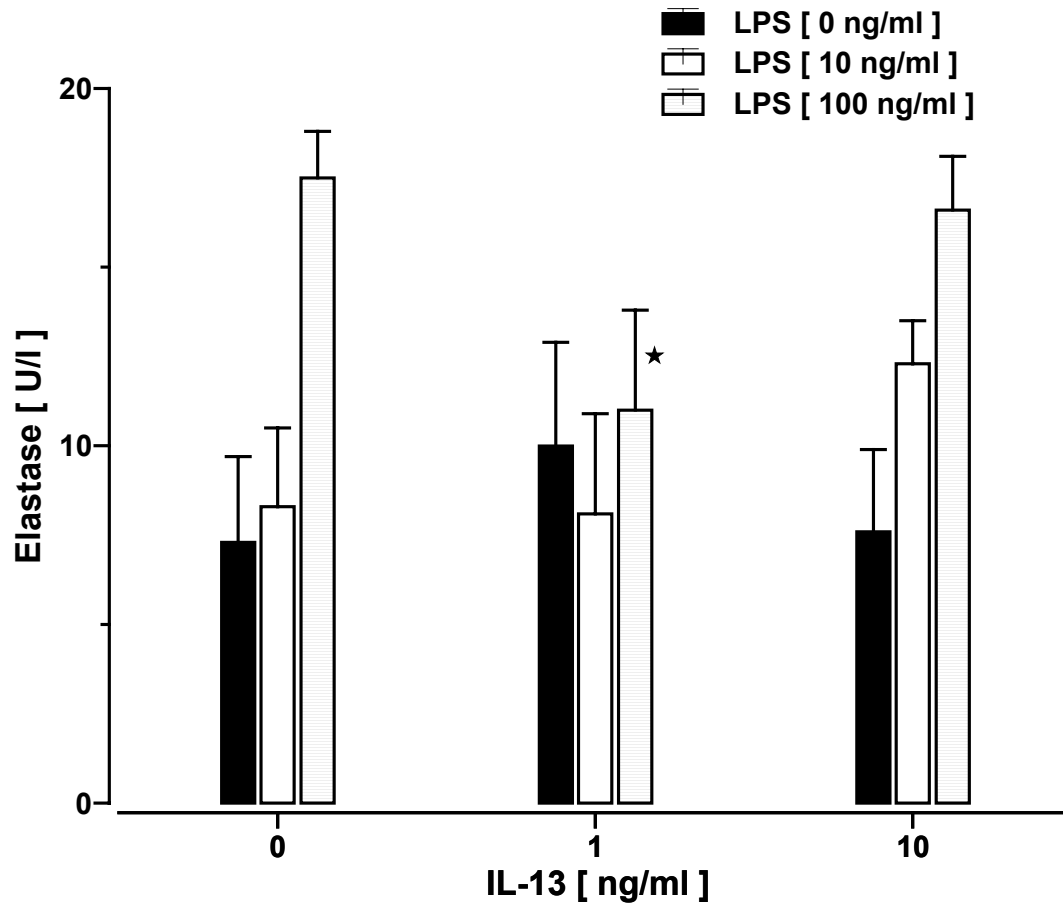


Abbildung 14

10×10^6 PMN / ml wurden gleichzeitig für 2 Stunden mit IL-13 (0,1 - 10ng/ml), LPS (10ng, 100ng/ml) und einem 1% -igen Zusatz von autologem hitzeinaktiviertem Serum zum Versuchspuffer inkubiert und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ A23 stimuliert. Die mitgeführten Kontrollansätze (0ng/ml IL-13) der jeweiligen Reihen wurden ohne IL-13 inkubiert. Hier aufgezeigt sind die Ergebnisse der IL-13 Konzentrationen (1ng, 10ng/ml). Die Elastase-Aktivität im Zellüberstand wurde als Degranulationsmarker gewertet und in $\mu\text{mol Substratumsatz} \times \text{Minute}^{-1} \times \text{Liter}^{-1} = (\text{U/l})$ angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\pm SEM) aus 4 unabhängigen Experimenten. [★ = $p < 0,05$ vs. 0 ng/ml IL-13].

4. Einfluß von Interleukin 13 auf den 5-Lipoxygenase-Metabolismus

Durch LPS-priming kommt es zu einer Aktivierung der Leukotriensynthese, gleichzeitig entfaltet Interleukin 13 einen hemmenden Einfluß auf den 5-Lipoxygenase-Metabolismus.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Auswirkungen der Koinkubation von Interleukin 13 und LPS auf die Leukotriensynthese untersucht. Dazu wurden Granulozyten unter den gleichen Versuchsbedingungen, die zuvor zur Veränderung der Degranulationsreaktion geführt haben, inkubiert und mit 1µM A23187 und freier Arachidonsäure stimuliert. Die nach Stimulation in den Zellüberstand freigesetzten 5-Lipoxygenase-Metaboliten wurden nach Festphasenextraktion mittels HPLC quantifiziert. Es konnten das LTB₄ und seine Omega-Oxidationsprodukte, die nicht enzymatisch entstandenen Zerfallsprodukte des LTA₄, sowie das 5-HETE chromatographisch aufgetrennt werden.

Die Zugabe von freier Arachidonsäure (10µM) zum Stimulationspuffer führt zur Unabhängigkeit der granulozytären Leukotriensynthese von der Mobilisation endogener Arachidonsäurepools, so daß die Arachidonsäure-Freisetzung nicht mehr den limitierenden Faktor der Leukotriensynthese darstellt. Für diese Versuchsanordnung wurden die Zellen der Kontrollgruppe wieder ausschließlich mit LPS (10ng, 100ng/ml) und die übrigen Zellansätze mit LPS (10ng, 100ng/ml) und IL-13 (1ng, 10ng/ml) für 2 Stunden koinkubiert. Simultan zur Stimulusgabe (1µM A23) erfolgte die Applikation von Arachidonsäure (10µM). Die nachfolgend im Zellüberstand quantifizierten Konzentrationen der 5-Lipoxygenase-Metaboliten lagen deutlich höher als man sie im Vergleich zu Versuchsansätzen ohne Arachidonsäure finden kann. Es zeigt sich ein LPS-Priming-Erfolg in den Kontrollgruppen, der für die im LTA₄-Decay zusammengefassten LTA₄-Hydrolyseprodukte deutlicher ausgefallen ist. Überdies zeigt IL-13 in der Gruppe der Zellen, welche mit 100ng/ml LPS inkubiert wurden, eine auffällige Hemmung der Leukotriensynthese. Diese wurde für die Leukotriene LTB₄ und 5-HETE signifikant. Dargestellt sind die Ergebnisse der einzelnen Metabolite in den Abb.15a-c.

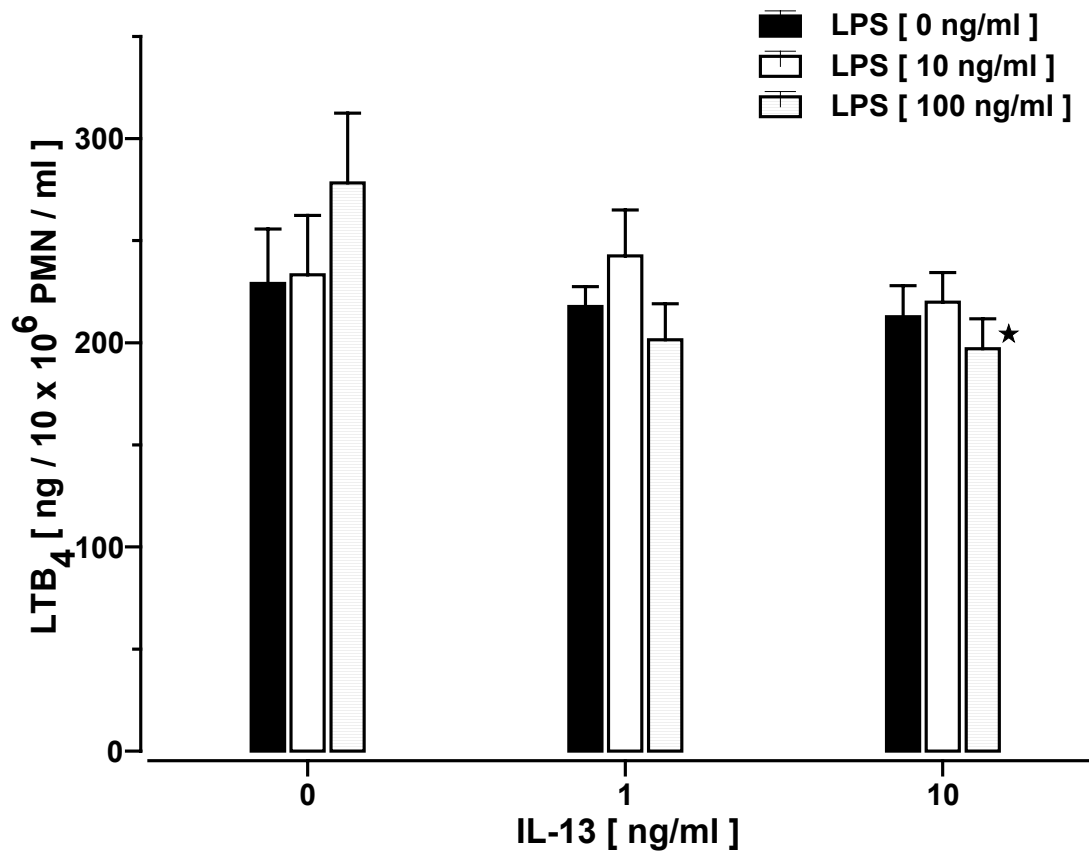


Abbildung 15a

10×10^6 PMN/ml wurden für 2 Stunden mit LPS (10ng, 100ng/ml) und IL-13 (1ng, 10ng/ml) in einem Puffer mit 1%-igem Zusatz von autologem hitzeinaktivierten Serum inkubiert. Eine mitangelegte Kontrollgruppe (0ng/ml IL-13) wurde nur mit LPS und Serum inkubiert. Danach erfolgte simultan zur Stimulusgabe ($1\mu\text{M}$ A23) die Applikation von freier Arachidonsäure ($10\mu\text{M}$). In der Kontrollgruppe zeigt sich die Aktivierung der Leukotriensynthese durch das LPS-priming. In den Zellansätzen, welche mit 100ng/ml LPS inkubiert wurden (graue Säulen), entfaltet sich eine signifikante Hemmung der Leukotriensynthese durch die Koinkubation mit IL-13. Hier dargestellt ist die LTB_4 -Freisetzung (Mittelwerte \pm SEM aus 4 Versuchen). [\star = $p < 0,05$ vs. 0 ng/ml IL-13].

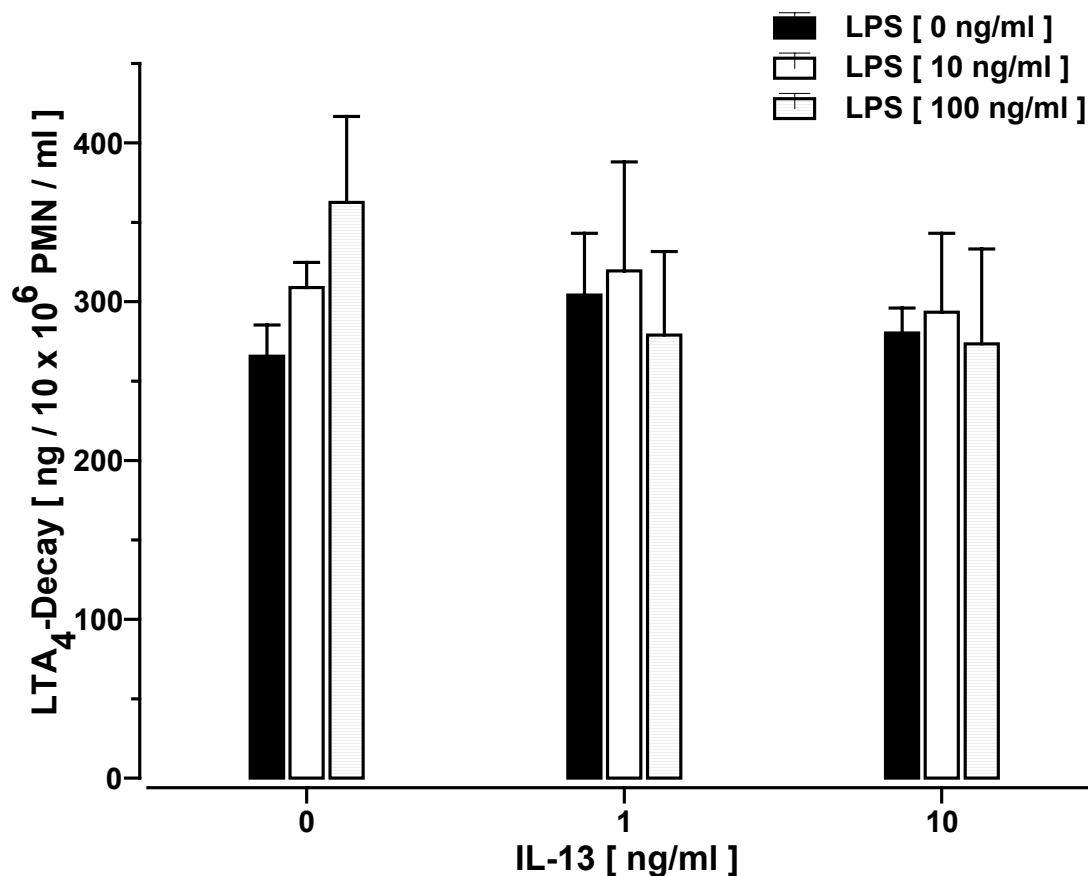


Abbildung 15b

10 x 10⁶ PMN/ml wurden für 2 Stunden mit LPS (10ng, 100ng/ml) und IL-13 (1ng, 10ng/ml) in einem Puffer mit 1%-igem Zusatz von autologem hitzeinaktivierten Serum inkubiert. Eine mitangelegte Kontrollgruppe (0ng/ml IL-13) wurde nur mit LPS und Serum inkubiert. Danach erfolgte simultan zur Stimulusgabe (1μM A23) die Applikation von freier Arachidonsäure (10μM). In der Kontrollgruppe zeigt sich signifikant die steigende Tendenz des LPS-Primings. In den Zellansätzen, welche mit 100ng/ml LPS inkubiert wurden (graue Säulen), präsentiert sich eine Hemmung der Leukotriensynthese durch die Koinkubation mit IL-13. Hier dargestellt ist die LTA₄-Synthese anhand der nicht enzymatischen Spaltprodukte des LTA₄ (Diastereomere des 6-trans-LTB₄ und des 5,6-di-HETE_s, zusammengefasst als LTA₄-decay). Angegeben sind die Mittelwerte +/- SEM aus 4 Versuchen.

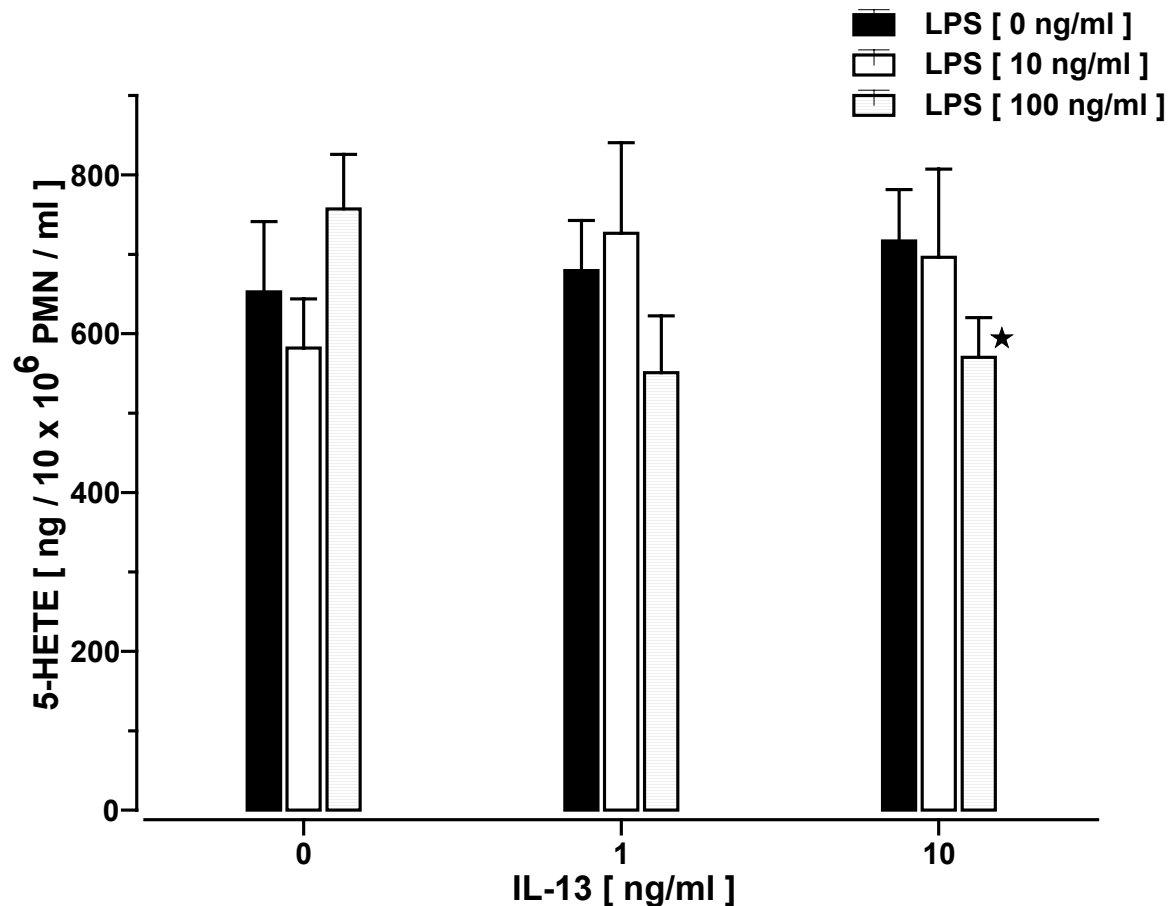


Abbildung 15c

10 x 10⁶ PMN/ml wurden für 2 Stunden mit LPS (10ng, 100ng/ml) und IL-13 (1ng, 10ng/ml) in einem Puffer mit 1%-igem Zusatz von autologem hitzeinaktivierten Serum inkubiert. Eine mitangelegte Kontrollgruppe (0ng/ml IL-13) wurde nur mit LPS und Serum inkubiert. Danach erfolgte simultan zur Stimulusgabe (1μM A23) die Applikation von freier Arachidonsäure (10μM). In der Kontrollgruppe zeigt sich tendenziell die aktivierende Wirkung des LPS-Primings, wenn auch der Zellansatz mit 10ng/ml LPS (weiße Säule) aus dem Verlauf herausfällt. In den Zellansätzen, welche mit 100ng/ml LPS inkubiert wurden (graue Säulen), präsentiert sich eine signifikante Hemmung der Leukotriensynthese durch die Koinkubation mit IL-13. Hier dargestellt ist die Freisetzung des 5-HETE_s (Mittelwerte +/- SEM aus 4 Versuchen). [★ = p < 0,05 vs. 0 ng/ml IL-13].

5. Einfluß von Interleukin 13 auf den PAF Metabolismus

Der durch LPS-priming gesteigerte PAF-Metabolismus kann durch die zusätzliche Inkubation mit Interleukin 13 nicht beeinflusst werden.

Eine weitere wichtige Reaktionsgröße der Neutrophilen Granulozyten stellt die Synthese des Plättchen-Aktivierenden-Faktors (PAF) dar. In einer Versuchsreihe haben wir den singulären Effekt einer LPS Inkubation und die mögliche Auswirkung einer gleichzeitigen Inkubation mit Interleukin 13 auf den Granulozyten untersucht. Dazu wurden 10×10^6 PMN/ml für 2 Stunden mit IL-13 (1ng , 10ng/ml) und LPS (10ng, 100ng/ml) inkubiert und anschließend mit $0,1\mu\text{M}$ fmlp stimuliert, bevor die Zellen einem Lipidextraktionsverfahren unterzogen werden konnten, welches den PAF für einen Bioassay extrahierte. Die gewonnenen Ergebnisse (Abb.16) zeigen die steigernde Wirkung des LPS-Primings, sowie die Unveränderbarkeit des Priming-Erfolges durch die gleichzeitige Inkubation mit IL-13.

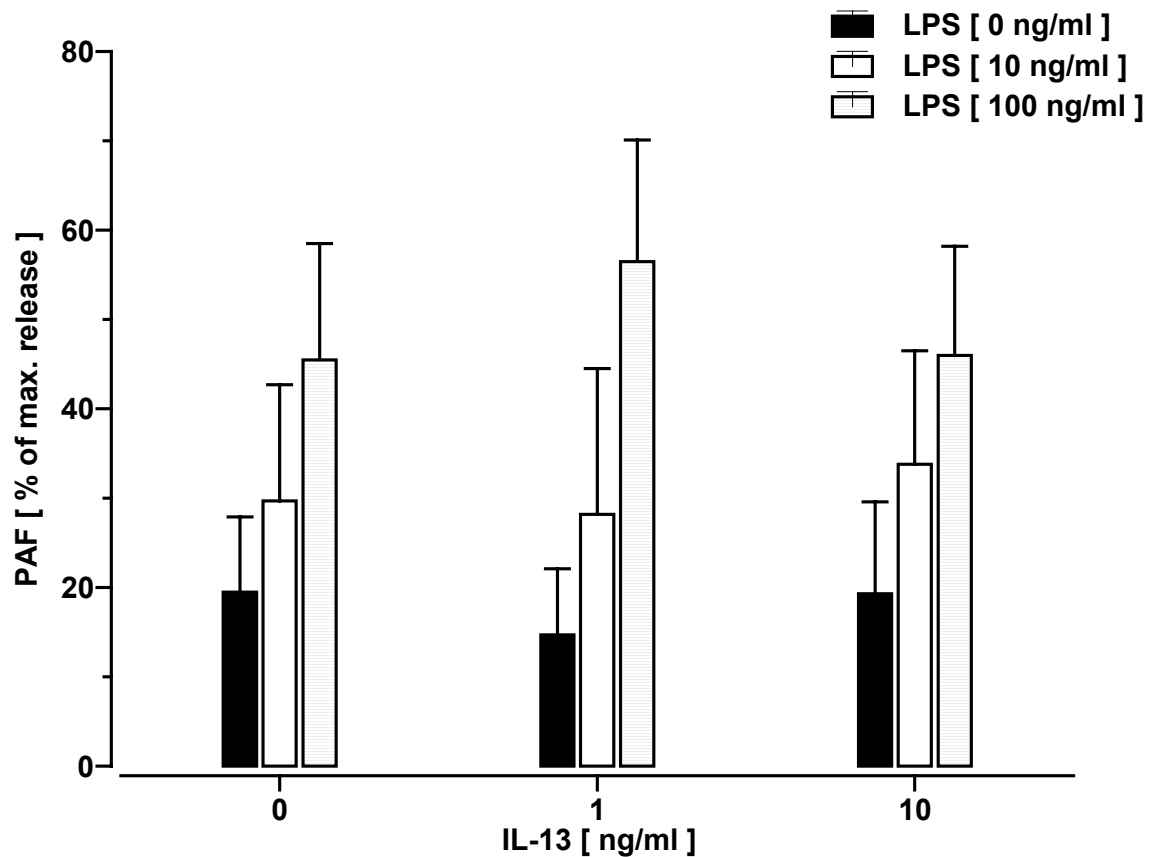


Abbildung 16

Nachdem 10×10^6 PMN / ml gleichzeitig für 2 Stunden mit IL-13 (1ng, 10ng/ml), LPS (10ng, 100ng/ml) und einem 1% -igen Zusatz von autologem hitzeinaktiviertem Serum zum Versuchspuffer inkubiert und anschließend mit $0,1 \mu\text{M}$ fmlp stimuliert wurden, erfolgte die Extraktion von freiem und zellgebundenem PAF. Das gewonnene PAF wurde in einem Bioassay durch seine Wirkung auf Kaninchenthrombozyten ($[^3\text{H}]$ -Serotonin-Freisetzung) quantifiziert. Die PAF-Synthese ist nach dem Auftragen einer Standardreihe graphisch ermittelt worden und prozentual zur maximalen Freisetzung dargestellt (jeweils Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Experimenten).

IV. Diskussion

1. Interleukin 13 verstärkt den LPS geprimten Respiratorischen Burst

LPS besitzt die Fähigkeit Zellen zu aktivieren und ihre Antwort auf einen zweiten Stimulus zu verstärken. So reagieren PMN auf das „priming“ mit LPS z.B. durch eine Steigerung des Oxidativen Bursts, der Degranulationsreaktion und der LTB₄-Synthese. Wie stark die Zellreaktion auf das exogen angebotene LPS ausfällt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. So gibt es verschiedene Makrophagen-Populationen, die aufgrund ihre Lokalisation chronisch (Lamina propria des Darmes, Leber oder Entzündungsgebieten) sehr hohen LPS Konzentrationen ausgesetzt sind. Es wäre für den Wirt fatal, würden diese Zellpopulationen im gleichen Maße auf ein LPS-priming reagieren wie periphere Makrophagen (Matthew & Hume, 1996). Ein weiterer wichtiger Faktor für das Ausmaß der Zellreaktion auf LPS ist das Vorliegen von LBP im Serum, was zur Komplexbildung mit LPS und Bindung an den spezifischen CD14 Rezeptor führt. Insgesamt hat die Komplex-Bildung eine Reaktionsverstärkung zur Folge.

Wir konnten zeigen, daß die 1%-ige Zugabe von Serum und damit die Zugabe von LBP zum Inkubationsmedium den LPS-Priming-Erfolg des Respiratorischen Burst maximal um den Faktor 5,1 steigern konnte, wobei im Vergleich geringere LPS Konzentrationen (max. 100ng/ml) nötig waren. Der optimale sekundäre Stimulus für diese Reaktion waren 0,1 µM fmlp, die optimale Inkubationszeit waren 2 Stunden. Diese von uns in Vorversuchen gefundenen optimalen Inkubationszeiten und Stimulus Konzentrationen entsprechen den bisherigen Veröffentlichungen über Inkubation und Stimulation von PMN (Guthrie et al., 1984).

Nachdem durch die entsprechende Vorgehensweise die Reproduktion des Primings des Oxidativen Burstes gelungen war, sollte die eigentliche Fragestellung, ob der Respiratorische Burst durch die Inkubation der Zellen mit Interleukin 13 zu beeinflussen ist, bearbeitet werden. Dazu wurde ein Versuchsansatz gewählt, bei dem die Zellen mit LPS und IL-13 koinkubiert wurden. Dieser Ansatz hat den Vorteil einer größeren Realitätsnähe zum entzündlichen Geschehen gegenüber einer alleinigen Inkubation mit IL-13, obwohl auch dieser Inkubationsansatz im Vergleich zu den komplexen Reaktionen in vivo nur ein reduziertes Modell darstellt.

Die Konfrontation der Zellen mit IL-13 zeigte tendenziell eine zusätzliche Steigerung der fmlp-induzierten Sauerstoffradikalgenerierung. Besonders bei höheren IL-13 Konzentrationen

(10ng/ml) läßt sich dieser Effekt beobachten. In einem nächsten Schritt erfolgte der 1%-ige Serumzusatz zum Inkubationspuffer. Auch bei diesem Versuchsansatz zeigte IL-13 die schon zuvor beobachtete tendenzielle Burststeigerung, wobei der Serumzusatz zu der bereits beschriebenen Sauerstoffradikal-Produktion auf höherem Niveau führte.

Bussolati und Mitarbeiter haben den gleichen Effekt der Steigerung der O_2^- Synthese durch ein dem IL-13 vergleichbaren Zytokin, dem IL-10, beobachtet. In ihrer Versuchsdurchführung wirkten LPS und IL-10 auf PMN und Monozyten ein und führten zu einer zeitabhängigen Steigerung der O_2^- Synthese (Bussolati et al., 1997).

Andere Arbeitsgruppen fanden widersprüchliche Ergebnisse bzgl. des direkten und des priming Effektes von anti-inflammatorischen Zytokinen auf den Oxidativen Burst von PMN.

So haben Réglier-Poupet und Mitarbeiter die Auswirkung der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10, IL-4 und IL-13 auf die H_2O_2 Produktion von PMN in Vollblut, die mit $TNF\alpha$ geprimt und mit fmlp stimuliert wurden, untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß die Interleukine keinen Einfluß auf den $TNF\alpha$ geprimten Burst zeigen und halten es für möglich, daß insbesondere die Isolationsverfahren anderer Autoren, die bereits Effekte beobachtet haben, für diese „Artefakte“ verantwortlich sind (Réglier-Poupet et al., 1998).

Sozzani und Mitarbeiter berichten, daß IL-13 den Protein Kinase C-getriggerten Oxidativen Burst in humanen Monozyten supprimiert. Diese Beobachtung erhielten sie durch die Stimulation von Monozyten mit dem PKC Aktivator 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), nachdem sie 5 Minuten vorher IL-13 zugesetzt hatten (Sozzani et al., 1995).

Darüber hinaus fanden Laichalk und Mitarbeiter ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von IL-10 auf die Superoxid Produktion von PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, PKC-Aktivator) stimulierten Zellen (Laichalk et al., 1996).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Wirkungen von Interleukin 13, oder auch von Interleukin 10 maßgeblich von dem Versuchsaufbau, den benutzten Stimuli, den untersuchten Priming-Agenzien und vom Zelltyp abhängen. Eine endgültige Schlußfolgerung ist derzeit nicht möglich.

2. Interleukin 13 führt über eine vermehrte Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Steigerung der Superoxidanion Radikal Produktion

Wie schon zuvor beschrieben führt die zusätzliche Inkubation mit IL-13 zu einer Steigerung der LPS aktivierten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. In der untersuchten Versuchsreihe kam der Proteinkinase C Inhibitor Bisindolylmaleimide, ein potenter und hochselektiver PKC Inhibitor, der für die Aufhebung der NADPH-Oxidase vermittelten O_2^- Produktion bekannt ist, zum Einsatz (Cabanis et al., 1996). In allen drei angelegten Versuchsreihen führte der Zusatz des Inhibitors zu einer deutlichen Hemmung des fmlp-ausgelösten oxidativen Burstes. Die Bestimmung der inhibitorischen Konzentrationen von 50% (IC_{50}) ergab für die Reihe der LPS-geprimten Superoxidanion Radikal Produktion einen Wert von 1,22 μM und für die mit LPS und IL-13 inkubierte Reihe einen Wert von 1,46 μM . Dieses Ergebnis zeigt, daß eine erhöhte Konzentration an Bisindolylmaleimide benötigt wird, um den durch IL-13 gesteigerten Effekt zu unterdrücken. Diese Beobachtung kann nun aber auch im umgekehrten Sinne interpretiert werden und läßt die Schlußfolgerung zu, daß IL-13 seine steigernde Wirkung auf den oxidativen Burst durch eine vermehrte Aktivierung von Proteinkinase C vermittelt. Die Aktivierung der Proteinkinase C erfolgt über die fmlp-Rezeptor- und G-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C, wodurch es zur Bildung der aktiven "Second Messengers" $Ins(1,4,5)P_3$ und Diacylglycerol (DAG) kommt. $Ins(1,4,5)P_3$ löst die Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Kalzium aus, welches zusammen mit dem gebildeten DAG die Proteinkinase C aktiviert. Interleukin 13 könnte auf einer Stufe der Signaltransduktionskette bis hin zur Proteinkinase C Einfluß auf deren Aktivierung nehmen. Eine genauere Untersuchung der möglichen Veränderungen an der Signaltransduktionskette durch IL-13 steht noch aus.

Studien wie die von Sozzani und Mitarbeiter, die TPA als direkten Aktivator der PKC benutzen, um den oxidativen Burst auszulösen, lassen Stufen in der Kette der Signaltransduktion aus. Dies mag eine Erklärung für die anscheinend widersprüchlichen IL-13 Effekte sein.

3. Interleukin 13 führt zur Hemmung der LPS getriggerten Degranulationsreaktion

In einer weiteren Versuchsreihe zum granulozytären Verhalten konzentrierten wir uns auf die Degranulationsreaktion. Zunächst konnten wir zeigen, daß die Inkubation der Zellen mit LPS und der nachfolgenden unspezifischen Stimulation mit dem Calciumionophor A23187 zu einer LPS-konzentrationsabhängigen Steigerung der Granula Ausschüttung führte. In einem nächsten Schritt inkubierten wir die Zellen gleichzeitig mit LPS und Interleukin 13. Mit dieser Versuchsanordnung konnten wir zeigen, daß IL-13 zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Degranulationsreaktion fähig ist. Es war zu beobachten, daß IL-13 Konzentrationen bis einschließlich 1ng/ml zu einer sukzessiven Hemmung der Elastase-Ausschüttung führte, die bei ansteigenden IL-13 Konzentrationen wieder auf das Niveau des Referenzwertes zurückkehrte.

Wie die von uns bis hierher gewonnenen Ergebnisse zeigen, hat IL-13 nicht ausschließlich anti-inflammatorische Eigenschaften sondern moduliert auf unterschiedliche Weise granulozytäre Reaktionen. Bei komplexen Versuchsanordnungen ist es oft schwierig, die verändernde Größe genau zu erfassen. So könnte der steigernde Effekt auf den Oxidativen Burst durch eine Verunreinigung des IL-13 mit LPS erklärt werden. Der jedoch gegensinnige (hemmende) IL-13 Effekt in der Degranulations-Versuchsreihe widerlegt eine solche Vermutung.

Bisher gibt es keine Untersuchungen von anderen Autoren, die den Einfluß von Interleukin 13 auf die Degranulationsreaktion untersucht haben. Eine Studie von Kusner und King beschreibt einen hoch-regulierenden Einfluß im Sinne von autocrinen und paracrinen Funktionen von extrazellulärer Protease (Elastase) in Entzündungsgebieten auf den Oxidativen Burst (Kusner & King, 1989). Ob auch im umgekehrten Falle Sauerstoffradikale innerhalb eines inflammatorischen Bezirkes einen verstärkenden Einfluß auf die Freisetzung von Granula haben, ist bisher noch nicht beschrieben worden. Diese Theorie würde jedoch einen Erklärungsansatz für die von uns gewonnene Beobachtung bieten die zeigte, daß IL-13 bis zu einer bestimmten Konzentration einen hemmenden Einfluß auf die Granula Exozytose entfaltet und bei weiterer Konzentrationssteigerung diese Wirkung wieder verschwindet. Es wäre denkbar, daß IL-13 an sich die Elastase-Ausschüttung hemmt und über eine weitere Zellreaktion im Sinne von Kusner et al. diese Hemmung wieder aufgehoben wird. In unserer Versuchsanordnung könnte eine erhöhte Ausschüttung von Sauerstoffradikalen, wie wir sie

bei steigenden IL-13 Konzentrationen beobachtet haben, in den Versuchspuffer über para- und autokrine Mechanismen zu einer Steigerung der Granula Exozytose geführt haben. Dieser para- bzw. autocrine Einfluß hätte dann eine stärkere Zellwirkung als der hemmende IL-13 Stimulus. Zu diesem Zeitpunkt ist jedoch dieser Erklärungsansatz nach meiner Einschätzung eine erneute Arbeitshypothese, die durch Versuche überprüft werden müßte.

4. Unter inflammatorischen Bedingungen hemmt Interleukin 13 den 5-Lipoxygenase-Metabolismus

Um einen in vivo ablaufenden inflammatorischen Prozeß so umfassend wie möglich nachzustellen, wurde in der Versuchsreihe der Lipidmediatorsynthese dem Stimulationspuffer freie Arachidonsäure hinzugegeben. Dies potenziert die Leukotriensynthese und macht sie unabhängig von dem limitierenden Faktor der Arachidonsäure-Freisetzung durch die Phospholipase A₂. In vivo sind während eines inflammatorischen Geschehens Zelltypen wie Mastzellen oder vaskuläre Endothelzellen an der Freisetzung von Arachidonsäure beteiligt, die dann für die Leukotriensynthese in Neutrophilen Granulozyten bereitsteht (Grimminger et al., 1991; Murakami et al., 1992). Wir konnten mit unserem Versuchsaufbau zeigen, daß Granulozyten unter inflammatorischen Bedingungen mit einer Steigerung der Lipidmediatorsynthese reagieren. Dazu wurden die Zellen zunächst mit LPS inkubiert und anschließend mit AA und A23187 stimuliert. In einer weiterführenden Versuchsanordnung war es uns dann möglich, diesen durch LPS gesteigerten Leukotrien-Metabolismus mittels Interleukin 13 zu unterdrücken. Es kam dabei zur quantitativen Abnahme von 5-HETE, LTB₄ und den LTA₄ Hydrolyse Produkten, die alle 5-HPETE als gemeinsame Ausgangssubstanz haben.

Der initiale Schritt in der Leukotrienbiosynthese ist die Aktivierung von Phospholipase A₂ (PLA₂), die Membranphospholipide hydrolysiert, um Arachidonsäure (AA) frei zu setzen. Dieser erste Schritt konnte durch die Zugabe von freier AA in unsere Versuchsanordnung umgangen werden. In einer Calcium- und ATP-abhängigen Reaktion kommt es in Folge zur Aktivierung der zytosolischen 5-Lipoxygenase (5-LO), welche zur Zellkernmembran transloziert und dort mit einem Membranprotein, dem 5-Lipoxygenase-Aktivierenden-Protein (FLAP) interagiert. Nach neuesten Kenntnissen übernimmt FLAP in diesem biosynthetischen Prozeß eine AA-weiterreichende Rolle, bei dem AA an FLAP bindet und der 5-LO zur Verstoffwechselung präsentiert wird (Peters-Golden, 1998). Das zunächst entstehende

Zwischenprodukt ist 5-HPETE, welches eine sofortige weitere enzymatische Umsetzung erfährt.

Unsere Theorie über den Mechanismus der Interleukin 13 hemmenden Wirkung begründet sich auf der Tatsache, daß es zur gleichzeitigen Hemmung von 5-HETE, LTB₄ und den LTA₄ Hydrolyse Produkten kommt, die alle ein und dieselbe Ausgangssubstanz haben, und daß der Stoffwechselprozeß Phospholipase A₂ unabhängig ist. Ein möglicher Angriffspunkt des IL-13 wäre entweder eine Hemmung der 5-LO selbst oder des FLAP's. Die beschriebene Theorie ist noch einmal in Abb.17 dargestellt.

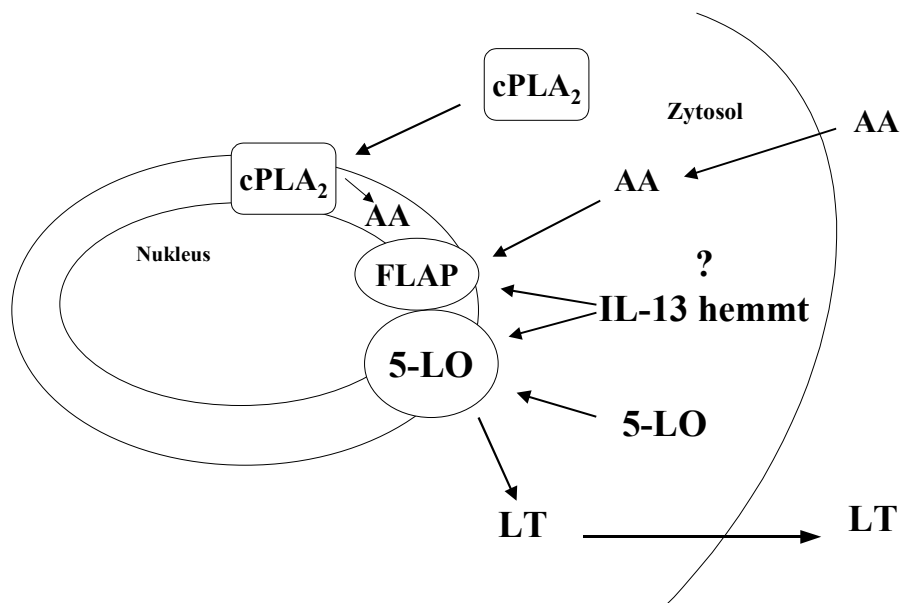


Abbildung 17

Der initiale enzymatische Schritt in der Leukotrien Biosynthese läuft an der Membran des Zellkerns ab. Zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) transloziert zur Kernmembran, um dort Phospholipide zu hydrolysieren und Arachidonsäure (AA) frei zu setzen. Die freigewordene AA bindet an das ebenfalls an der Kernmembran lokalisierte 5-Lipoxygenase-Aktivierende-Protein (FLAP) und wird durch dieses der 5-Lipoxygenase (5-LO) präsentiert, welche selbst zum Zeitpunkt der Aktivierung zur Kernmembran gewandert ist. Im Verlauf der Synthese entstehen aus der enzymatischen AA Umsetzung die Leukotriene (LT). Ein möglicher Angriffspunkt des Interleukin-13 (IL-13) wäre entweder das FLAP oder die 5-LO (siehe Text); (Abb. frei nach Peters-Golden, 1998).

Eine weitere Veröffentlichung, die sich mit den Auswirkungen von IL-13 auf die granulozytäre Leukotrien-Biosynthese beschäftigt, stammt von Zaitu und Mitarbeiter (Zaitu et al., 2000). In den Versuchsansätzen dieser Arbeit wurden PMN's von gesunden Spendern allein mit IL-13 für bis zu 9 Stunden inkubiert, um dann mit A23187 stimuliert zu werden. Die Ergebnisse zeigten eine gesteigerte LTB₄-Synthese, die mit der dritten Stunde begann und ihr Maximum nach der sechsten Stunde hatte. Weiterführende Untersuchungen zeigten eine gesteigerte Protein-Synthese der LTA₄ Hydrolase als die wahrscheinliche Ursache. Ebenfalls untersucht wurde die Protein-Synthese von cPLA₂ und 5-LO, die sich unverändert darstellten. Diese Ergebnisse legen nahe, daß IL-13 transcriptional oder post-transcriptional die LTB₄ Synthese auf der Ebene der LTA₄ Hydrolase hochreguliert.

Dieses sehr interessante und zu unseren Versuchen zunächst widersprüchliche Ergebnis wurde unter gänzlich anderen Versuchsbedingungen durchgeführt. So fanden unsere Versuche unter inflammatorischen Bedingungen statt, bei denen die Zellen während der Inkubation mit IL-13 gleichzeitig einem LPS Stimulus ausgesetzt waren und kurz vor der reaktionsauslösenden A23187 Stimulation zusätzlich mit AA konfrontiert wurden. Darüber hinaus beendeten wir bereits nach 2 Stunden die Inkubationszeit, noch bevor die gesteigerte LTA₄ Hydrolase Proteinbiosynthese in den oben genannten Versuchen ihre Auswirkungen zeigte.

Es bleibt also festzuhalten, daß sowohl der untersuchte Zeitraum als auch das Milieu (inflammatorisch), in welchem sich die Zellen befinden, einen Einfluß auf die Wirkungsweise des IL-13 zu haben scheinen.

5. Unter inflammatorischen Bedingungen kommt es zur Steigerung der PAF Biosynthese, die sich durch IL-13 nicht beeinflussen läßt

Ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der bioaktiven Lipiden neben den Leukotrienen ist der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF), der unter anderem von polymorphkernigen Granulozyten gebildet wird. Für uns war die Fragestellung interessant, in wie weit sich der PAF Metabolismus durch IL-13 unter inflammatorischen Bedingungen beeinflussen läßt. Wir haben beobachtet, daß PMN, welche mit LPS inkubiert wurden, nach Stimulation mit fmlp eine Steigerung der PAF-Synthese in Abhängigkeit von der LPS Konzentration zeigten. Eine zusätzliche Inkubation der PMN mit IL-13 vermochte es nicht die durch LPS ausgelöste Synthesesteigerung zu verändern.

Bussolati und Mitarbeiter beschreiben in einer ihrer Arbeiten, daß LPS einen stimulierenden Effekt auf die PAF Synthese hat. Sie konnten zeigen, daß sich dieser Effekt mit einem anti-CD14 monoclonalen Antikörper unterdrücken ließ und konnten ebenso nachweisen, daß IL-10 in der Lage war, die durch LPS gesteigerte PAF-Syntheseleistung weiter zu verstärken. (Bussolati et al., 1997).

In einer weiteren Studie erwähnen sie, daß die alleinige Stimulation der Monozyten oder auch PMN mit IL-10 nicht ausreicht, um eine gesteigerte PAF-Synthese auszulösen. Dies gelang erst, als die Zellen mit LPS stimuliert wurden. Ebenfalls wurden Monozyten von Patienten mit aktivem und inaktivem systemischen Lupus Erythematodes untersucht. Während die Monozyten von den Patienten im inaktiven Stadium nicht durch Stimulation mit IL-10 zu einer gesteigerten PAF-Synthese veranlaßt werden konnten, war dies bei den Monozyten von Patienten im aktiven Stadium möglich. Diese zuletzt genannten Zellen waren also für eine IL-10 Antwort aktiviert und geprimt (Bussolati et al., 2000).

Ob ein Zytokin eine Wirkung an den Zielzellen entfalten kann, hängt also immer von dem Milieu, in welchem sich die Zellen befinden sowie von der Vorstimulation ab. In unseren Versuchsanordnungen war IL-13 weder alleine noch unter inflammatorischen Bedingungen (LPS-Priming) in der Lage, einen Einfluß auf den PAF-Metabolismus zu entfalten.

V. Zusammenfassung

IL-13 ist ein Polypeptidhormon, welches von aktivierten TH2-Helferlymphozyten gebildet wird. Es besitzt eine Reihe immunmodulierender Eigenschaften auf B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, PMN und Endothelzellen. Es tritt neben anderen anti-inflammatorischen Zytokinen wie dem IL-10 und IL-4 während der immunparalytischen Phase der Sepsis auf. IL-13 wird in die Gruppe der anti-inflammatorischen Zytokine eingeordnet, weil es *in vitro* die Eigenschaft besitzt, die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-1, IL-6 sowie IL-8 zu unterdrücken. Wenige und teilweise widersprüchlich erscheinende Informationen sind bisher über die direkte und die primäre Wirkung von IL-13 auf PMN bekannt.

In dieser Arbeit wurde experimentell unter inflammatorischen Bedingungen die Wirkung von IL-13 auf den granulozytären Oxidativen Burst, die Degranulationsreaktion sowie den Lipidmediatorstoffwechsel untersucht.

Durch LPS ließ sich der fmlp-induzierte Oxidative Burst steigern. Eine weitere Steigerung war durch die Zugabe von Serum zum Inkubationspuffer möglich. Die zusätzliche Inkubation der PMN mit IL-13 führte tendenziell zu einer weiteren Verstärkung des Oxidativen Burstes. Der Einsatz des PKC Inhibitors Bisindolylmaleimide führte sowohl in der Versuchsreihe mit IL-13 als auch ohne IL-13 zu einer Hemmung des Oxidativen Burstes. Nach der Inkubation mit IL-13 zeigte sich, daß im Vergleich eine höhere IC₅₀ nötig war. Diese Beobachtung läßt die Schlußfolgerung zu, daß IL-13 auf einer Stufe der Signaltransduktionskette bis hin zur PKC Einfluß auf deren Aktivierung nimmt.

Weiterhin konnten wir zeigen, daß IL-13 zu einer Hemmung der Degranulationsreaktion fähig ist. IL-13 Konzentrationen bis einschließlich 1ng/ml führten zu einer dosisabhängigen Hemmung der Elastase-Ausschüttung, die bei ansteigenden IL-13 Konzentrationen wieder auf das Niveau des Referenzwertes zurückkehrte. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt könnte die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen bei höheren IL-13 Konzentrationen sein, die im Sinne von autocrinen und paracrinen Funktionen Einfluß auf die Degranulationsreaktion nehmen.

Die untersuchten Auswirkungen von IL-13 auf die Lipidmediatorsynthese umfaßten die Leukotriensynthese und den PAF-Metabolismus.

Die Leukotriensynthese konnte unter inflammatorischen Bedingungen, d.h. unter Zugabe von LPS und AA zum Inkubationspuffer, gesteigert werden. Relevant für unsere Untersuchungen waren die Zerfallsprodukte des LTA₄, das LTB₄ und das 5-HETE. Durch die zusätzliche Gabe

von IL-13 kam es zur Hemmung der zuvor genannten Syntheseprodukte. Da die untersuchten Lipoxygenase-Produkte sich von 5-HPETE ableiten und die Synthese durch die Gabe von AA unabhängig von der PLA2 war, muß der Einfluß von IL-13 vor diesem Syntheseschritt liegen. Die von uns gewonnenen Ergebnisse im Rahmen der PAF-Synthese Untersuchungen zeigen eine steigernde Wirkung des LPS-Priming sowie die Unveränderbarkeit des Priming-Erfolges durch die gleichzeitige Inkubation mit IL-13.

IL-13 wird bisher in die Gruppe der anti-inflammatorischen Interleukine eingeordnet. Die von uns gewonnenen Ergebnisse in Bezug auf die granulozytäre Leukotriensynthese und die Degranulationsreaktion bestätigen diese Einordnung. Der steigernde Einfluß von IL-13 auf das NADPH Oxidase System widerspricht jedoch dieser Kategorisierung. IL-13 ist ein Zytokin mit größtenteils anti-inflammatorischer Wirkung, das unter inflammatorischen Bedingungen auf Teile des PMN Stoffwechsels pro-inflammatorisch wirken kann.

VI. Summary

IL-13 is a polypeptide hormone which derives from activated TH2-lymphocytes.

B-lymphocytes, macrophages, monocytes, PMN and endothelial cells respond to its range of immunomodulating properties. IL-13 appears during the immunoparalytic phase of sepsis, along with other anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and IL-4. It is placed in the group of anti-inflammatory cytokines as it has the in vitro property of suppressing the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IL-1, IL-6 and IL-8. At present, little and seemingly partially contradictory information is known about the direct and the priming effect of IL-13 on PMN.

In this experimental research, the effect of IL-13 under inflammatory conditions on the PMN oxidative burst, degranulation, as well as the lipid mediator metabolism were examined.

The fmlp-triggered oxidative burst was enhanced by LPS. It was possible to further enhance the LPS response through the addition of serum to the incubation buffer. Additional incubation of PMN with IL-13 tended to further amplify the oxidative burst. The use of PKC inhibitor bisindolymaleimide in a series of experiments, both with and without IL-13, led to the inhibition of the oxidative burst. In the series with IL-13, a higher IC₅₀ was necessary to inhibit the oxidative burst in comparison to the series without. This observation led to the conclusion that IL-13 influences the activation of PKC during stages in the signal transduction chain.

Furthermore we were able to show that IL-13 is capable of inhibiting degranulation. IL-13 concentrations up to and including 1ng/ml led to a dose-dependent inhibition of the elatase release which, with increasing IL-13 concentrations, returned once again to the level of reference. An explanation for this fact could be the increased formation of oxygen radicals with higher IL-13 concentrations which influences degranulation through autocrine and paracrine mechanisms.

The examined effects of IL-13 on the lipid mediator synthesis included leukotrien synthesis and PAF metabolism.

The leukotrien synthesis could be increased under inflammatory conditions, i.e. through the addition of LPS and AA to the incubation buffer.

The LTA₄ decay, LTB₄ and 5-HETE were relevant for our examination, the inhibition of these synthesis products being possible with IL-13.

Since the examined lipoxygenase products derive from 5-HPETE and the synthesis did not depend on PLA2 through the addition of AA to the incubation buffer, IL-13 must have an influence prior to this synthesis step.

Our results in relation to the PAF synthesis examination show an increasing effect of the LPS-priming as well as the unchangeability of the priming success through the concurrent incubation with IL-13.

At present IL-13 is placed in the anti-inflammatory interleukine group. The results of our research in relation to the leukotrien synthesis and degranulation of neutrophils confirm this categorisation. However the increasing influence of IL-13 on the NADPH Oxidase system contradicts this categorisation.

IL-13 is a cytokine which, for the most part, has an anti-inflammatory effect. It can however have a pro-inflammatory effect under inflammatory conditions on parts of the PMN metabolism.

VII. Literaturverzeichnis

- Abo A., Webb M.R., Grogan A., and Segal A.W.** Activation of the NADPH oxidase involves the dissociation of p21^{rac} from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J* 298: 585-91, 1994.
- Abraham E., Wunderink R., Silverman H., Perl T.M., Nasraway S., Levy H., Bone R., Wenzel R.P., Balk R., Allre R., Pennington Le, and Wherry J.C.** The TNF- α Mab sepsis study group. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor α in patients with sepsis syndrome. *JAMA* 237: 934-41, 1995.
- Antal-Szalmas P.** Evaluation of CD14 in host defence. *Eur J Clin Invest* 30: 167-79, 2000.
- Aoki H., Kodama M., Tani T., and Hansawa K.** Gram-negative bacteraemia, controlled clinical trial, septic shock, antibody. *Am J Surg* 16: 412-7, 1994.
- Babior B.M.** The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 73: 599-601, 1984.
- Bainton D.F., and Farquhar M.G.** Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 28: 277, 1966.
- Bainton D.F., Ulliyot J.L., and Fraquahr M.G.** The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 134: 907, 1971.
- Bhakdi S., Walev I., Jonas D., Palmer M., Weller U., Suttorp N., Grimminger F., and Seeger W.** Pathogenesis of sepsis syndrome: possible relevance of pore-forming bacterial toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* 216:101-18, 1996
- Bjork J., Lindbom L., Gerdin B., Smedegard G., Arfors K.E., and Benveniste J.** PAF-acether (platelet-activating factor) increases microvascular permeability and affects endothelium-granulocyte interaction in microvascular beds. *Acta Physiol Scan* 119: 305-8, 1983.
- Blank M.L., Snyder F., Byers L.W., Brooks B., and Moorhead E.E.** Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Comm* 90: 1194-220, 1979.

- Bligh E.G., and Dyer W.J.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:753, 1953.
- Bochner B.S., Klunk D.A., Sterbinsky S.A., Coffman R.L., and Schleimer R.P.** IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J Immunol* 154: 799-803, 1995.
- Bone R.C., Fisher Jr. C.J., Clemmer T.P., Slotman G.J., Metz C.A., and Balk R.A.** Sepsis Syndrome: A valid clinical entity. Methylprednisolone severe sepsis study group. *Crit Care med* 17: 389-93, 1989.
- Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., and Sibbald W.J.** Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101 (6): 1644-55, 1992.
- Borregaard N., Heiple J.M., Simons E.R., and Clark R.A.** Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: Translocation during activation. *J Cell Biol* 97: 52, 1983.
- Borregaard N., Lollike K., Kjeldsen L., Sengeløv H., Bastholm L., Nielsen M.H., and Bainton D.F.** Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol* 51: 187, 1993.
- Borregaard N., Sehested M., Nielsen B.S., Sengeløv H., and Kjeldsen L.** Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood* 85: 812, 1995.
- Borregaard N.** Current concepts about neutrophil granule physiology. *Curr Opin Hematol* 3: 11-8, 1996.
- Borregaard N., and Cowland J.B.** Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89(10): 3503-21, 1997.
- Boyum A.** Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scan J Immunol (S5)*: 9-15, 1976.

- Brigham K.L., and Meyrick B.** Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 133: 913-27, 1986.
- Burg N.D., and Pillinger M.H.** The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clinical Immunol* 99(1): 7-17, 2001.
- Bussolati B., Mariano F., Montrucchio G., Piccoli G., and Camussi G.** Modulatory effect of interleukin-10 on the production of platelet-activating factor and superoxide anions by human leukocytes. *Immunol* 90(3): 440-7, 1997.
- Bussolati B., Rollino C., Mariano F., Quarello F., and Camussi G.** IL-10 stimulates production of platelet-activating factor by monocytes of patients with active systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 122: 471-6, 2000.
- Cabanis A., Gressier B., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Cazin M., and Cazin J.C.** Effect of the protein kinase C inhibitor GF 109 203X on elastase release and respiratory burst of human neutrophils. *Gen Pharmac* 27(8): 1409-14, 1996.
- Calafat J., Kuijpers T.W., Janssen H., Borregaard N., Verhoeven A.J., and Roos D.** Evidence for small intracellular vesicles in human blood phagocytes containing cytochrome b₅₅₈ and the adhesion molecule CD11b/CD18. *Blood* 81: 3122, 1993.
- Camussi G., Aglietta M., Coda R., Bussolino F., Piacibello W., and Tetta C.** Release of platelet-activating factor (PAF) and histamine II. The cellular origin of human PAF: monocytes, polymorphonuclear neutrophils and basophils. *Immunology* 42: 191-9, 1981.
- Casimir C.M., and Teahan C.G.** 3. The respiratory burst of neutrophils and its deficiency. *Immunopharmacology of Neutrophils* ISBN 0-12-339250-0: 27-46, 1994.
- Claesson H.E., and Haeggström J.** Human endothelial cells stimulate leukotrien synthesis and convert granulocyte released leukotrien A₄ into leukotrienes B₄, C₄, D₄ and E₄. *Eur J Biochem* 173: 93-100, 1988.
- Cohen H.J., and Chovaniec M.E.** Superoxide-generation by digitonin-stimulated guinea-pig granulocytes. *J Clin Invest* 61: 1081-7, 1978
- Condliffe A.M., Kitchen E., and Chilvers E.R.** Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clinical Science* 94: 461-71, 1998.

- Dang P.M., Fontayne A., Hakim J., El Benna J., and Perianin A.** Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47^{phox} and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol* 166(2): 1206-13, 2001.
- DeLeo F.R., and Quinn M.T.** Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol* 60: 677-91, 1996.
- Delpedro A.D., Baejavel M.J., Mamdouh Z., Faure S., and Bakouche O.** Signal transduction in LPS-activated aged and young monocytes. *J Interferon Cytokine Res* 18: 429-37, 1998.
- Demopolis C.A., Pinkard R.N. and Harahan D.J.** Platelet-activating factor. Evidence for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine as the active component. A new class of lipid chemical mediators. *J Biol Chem* 254: 9355-8, 1979.
- Deventer van S.J., Buller H.R., ten Cate J.W., Sturk A., and Pauw W.** Endotoxaemia: an early predictor of septicaemia in febrile patients. *Lancet* 1988: 605-9, 1988.
- Dhainaut J.F.A., Vincent J.L., Richard C., Lejeune P., Martin C., Fierobe L., Stephens S., Ney U.M., and Sopwith M.** CDP571, a humanized antibody to human tumor necrosis factor- α : safety, pharmacokinetics, immune response, and influence of the antibody on cytokine concentrations in patients with septic shock. The CDP571 sepsis study group. *Crit Care Med* 23(9): 1461-9, 1995.
- Feinmark S.J., and Cannon P.J.** Endothelial cell leukotrien C₄ synthesis results from intercellular transfer of leukotrien A₄ synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 261: 16466-72, 1986.
- Fisher C.J., Opal S.M., Dhainaut J.F., Stephens S., Zimmerman J.L., Nightingale P., Harris S.J., Schein R.M.H., Panacek E.A., Vincent J.L., Foulke G.E., Warren E.L., Garrard C., Park G., Bodmer M.W., Cohen J., Van der Linden C., Cross A.S., and Sadoff J.C.** Influence of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 sepsis syndrome study group. *Crit Care Med* 21(3): 318-27, 1993.
- Fujishima S., and Aikawa N.** Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation: review article. *Intensive Care Med* 21: 277-85, 1995.

- Gerard C.** Bacterial Infection. For whom the bell tolls [news; comment]. *Nature* 395: 217-19, 1998.
- Grimminger F., Menger M., Becker G. and Seeger W.** Potentiation of leukotriene production following sequestration of neutrophils in isolated lungs: indirect evidence for intercellular leukotriene B₄ transfer. *Blood* 72: 1687-92, 1988.
- Grimminger F., and Seeger W.** Regulation inflammatorischer Abläufe – Angriffspunkte und Grenzen steroidaler Antiphlogistika. *Medwelt* 41: 951-64, 1990.
- Grimminger F., Sibelius U., and Seeger W.** Amplification of LTB₄-generation in AM-PMN-cocultures: Transcellular 5-lipoxygenase-metabolism. *Am J Physiol.* 261: 195-203, 1991.
- Grimminger F., Walmrath H.D., Seeger W., and Lasch H.G.** Granulozyten-Endothel-Interaktion. *Hämostaseologie* 14: 7-15, 1994.
- Grimminger F., Mayer K., and Seeger W.** Gibt es eine gesicherte Immuntherapie bei der Sepsis? *Internist* 38: 541-52, 1997.
- Guthrie L.A., Mc Phail L.C., Henson P.M., and Johnston Jr. R.B.** Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites: evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med* 160: 1656-71, 1984.
- Hailman E., Lichenstein H.S., Wurfel M.M., Miller D.S., Johnson D.A., Kelley M., Busse L.A., Zukowski M.M., and Wright S.D.** Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD 14. *J Exp Med* 179: 269-77, 1994.
- Hammarström S.** Leukotrienes *Ann Rev Biochem* 52: 355-77, 1983.
- Hasty K.A., Hibbs M.S., Kang A.H., and Mainardi C.L.** Secreted forms of human neutrophil collagenase. *J Biol Chem* 261: 5645, 1986.
- Hatzelmann A., Fruchtmann R., Mohrs K.H., Raddatz S., and Müller-Peddinghaus R.** Ca²⁺-ionophore A23187 stimulated secretion of azurophilic granules in human polymorphonuclear leukocytes is largely mediated by endogenous formed leukotriene B₄. *Biochem Pharmacol* 48: 31-9, 1994.

- Henderson W.R. Jr.** Eicosanoides and platelet-activating factor in allergic respiratory disease. *Am Rev Respir Dis* 143: 86-90, 1991.
- Henderson W.R. Jr.** The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med* 121: 684-97, 1994.
- Henson P.M.** Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitised mononuclear leukocytes and antigen. *J Exp Med* 131: 287-306, 1969.
- Iyer S.S., Pearson D.W., Nauseef W.M., and Clark R.A.** Evidence for a readily dissociable complex of p47^{phox} and p67^{phox} in cytosol of unstimulated human neutrophils. *J Biol Chem* 269: 22405-11, 1994.
- Janoff A.** Elastase in tissue injury. *Annu Rev Med* 36: 207-16, 1985.
- Joka T., and Obertacke U.** Neue medikamentöse Behandlung im ARDS: Effekt einer intrabronchialen xenogenen Surfactantapplikation. *Z Herz-, Thorax-, Gefäßchir* 3: 21-4, 1989.
- Kramps J.A.** L-pyroglutamyl-L-propyl-L-valine-p-nitro-anilide, a high specific substrate for granulocyte elastase. *Scan J Clin Lab Invest* 43 : 427-32, 1983.
- Kubes P.** Polymorphonuclear leukocytes-endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. *Can J Pharmacol* 71: 88-97, 1993.
- Kusner D.J., and King C.H.** Protease-modulation of neutrophil superoxide response. *J Immunol* 143(5): 1696-702, 1989.
- Laichalk L.L., Danforth J.M., and Standiford T.J.** Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 15(4): 181-7, 1996.
- Lefering R., and Neugebauer E.A.** Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. *Crit Care Med* 23: 1294-303, 1995.
- Leffel M.S., and Spitznagel J.K.** Association of lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 6(5): 761-5, 1972.

- Leffel M.S., and Spitznagel J.K.** Intracellular and extracellular degranulation of human polymorphonuclear azurophil and specific granules induced by immune complexes. *Infect Immun* 10: 1241, 1974.
- Lentsch A.B., Czermak B.J., Jordan J.A., and Ward P.A.** Regulation of acute lung inflammatory injury by endogenous IL-13. *J. Immunol* 162: 1071-6, 1999.
- Martin T.R., Mathison J.C., Tobias P.S., Leturcq D.J., Moriarty A.M., Maunder R.J., and Ulevitch R.J.** Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide Implications for cytokine production in normal and injured lungs. *J Clin Invest* 90: 2209-19, 1992.
- Mathews W.R., Rokach J., and Murphy R.C.** Analysis of leukotrienes by high pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 118: 96-101, 1981.
- Mathison J.C., Tobias P.S., Wolfson E., and Ulevitch R.J.** Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J Immunol* 149: 200-6, 1992.
- Matthew J.S., and Hume D.A.** Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol* 60: 8-26, 1996.
- McColl S.R., and Showell H.J.** 5. Neutrophil-derived inflammatory mediators. *Immunopharmacology of Neutrophils* ISBN 0-12-339250-0: 95-105, 1994.
- McDonald P.P., McColl S.R., Braquet P. and Borgeat P.** Autocrine enhancement of leukotrien synthesis by endogenous leukotrien B₄ and platelet-activating factor in human neutrophils. *Br J Pharmacol* 111: 852-60, 1994.
- McPhail L.C., and Harvath L.** 3. Signal transduction in neutrophil oxidative metabolism and chemotaxis *The Neutrophil* edited by Abramson J.S., Wheeler J.G., IRL Press at Oxford University Press, 63-91, 1994.
- Medzhitov R., Preston H.P., and Janeway C.A. Jr.** A human homologue of the Drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-7, 1997.
- Mueller H.W., O'Flathery J.T., and Wykle R.L.** Biosynthesis of platelet-activating factor in rabbit polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem* 258: 6213-18, 1984.

- Murakami M., Kudo I., Umeda M., Matsuzawa A., Takeda M., Komada M., Fujimori Y., Takahashi K., and Inoue K.** Detection of three distinct phospholipases A2 in cultured mast cells *J Biochem* 111: 175-81, 1992.
- Murphy R.C.; Hammarström S., Jörnvall H., and Samuelsson B.** Leukotrien C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11603-6, 1992.
- Muzio M., Re F.; Sironi M., Polentarutti N., Minty A., Caput D., Ferrara P., Mantovani A., and Colotta F.** Interleukin 13 induces the production of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) and the expression of the mRNA for the intracellular (Keratinocyte) form of IL-1ra in human myelomonocytic cells. *Blood* 83 (7): 1738-43, 1994.
- Park J.W., Ma M.C., Ruedi J.M., Smith R.M., and Babior B.M.** The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a M(r) approximately 240,000 complex that acquires a membrane-binding site during activation of the oxidase in a cell-free system. *J Biol Chem* 267: 17327-32, 1992.
- Park J.W., El Benna J., Scott K.E., Christensen B.L., Channock S.J., and Babior B.M.** Isolation of a complex of respiratory burst oxidase components from resting neutrophil cytosol. *Biochemistry* 33: 2907-11, 1994.
- Parkos C.A., Allen R.A., Cochrane C.G., and Jesaitis A.J.** Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is composed of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest* 80: 732-42, 1987.
- Peters-Golden M.** Cell Biology of the 5-Lipoxygenase Pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 157: S227-S32, 1998.
- Petty T.L.** Adult respiratory distress syndrome: Definition and historical perspective. *Clin Chest Med* 3: 3-7, 1982.
- Pick E., Gorzalczany Y., and Engel S.** Role of the rac1 p21-GDP-dissociation inhibitor for rho heterodimer in the activation of the superoxide-forming NADPH oxidase of macrophages. *Eur J Biochem* 217: 441-55, 1993.

- Pinckard R.N., Farr R.S., and Hanahan D.J.** Physio-chemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitised basophils. *J Immunol* 123: 1847-54, 1979.
- Punnonen J., and de Vries J.E.** IL-13 Induces Proliferation , Ig isotype switching and Ig synthesis by immature human fetal B cells. *J Immunol* 152: 1094-102, 1994.
- Puybasset L., Rouby J.J., Mourgeon E., Stewart T.E., Cluzel P., Arthaud M., Poete P., Bodin L., Korinek A.M., and Viars P.** Inhaled nitric oxide in acute respiratory failure: dose-response curves. *Int Care Med* 20: 319-27, 1994.
- Quinn M.T., Mullen M.L., Jesaitis A.J., and Linner J.G.** Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils – Colocalization and cotranslocation with cytochrome b₅₅₉. *Blood* 79: 1563-73, 1992.
- Reglier-Poupet H, Hakim J, Gougerot-Pocidallo MA, and Elbim C.** Absence of regulation of human polymorphonuclear oxidative burst by interleukin-10, interleukin-4, interleukin-13 and transforming growth factor- β in whole blood. *Eur Cytokine Netw* 9(4): 633-8, 1998.
- Riede U.N., and Schaefer H.E.** Allgemeine und spezielle Pathologie Georg Thieme Verlag Stuttgart 4. Auflage: 402-7, 1995.
- Rinaldo J.E., and Rogers R.M.** Adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 315: 578-9, 1986.
- Rossaint R., Lopez S., Falke K.J., Slama K., Pison U., and Zapol W.M.** Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 328: 399-405, 1993.
- Samuelsson B., Borgeat P., Hammarstrom S., and Murphy R.C.** Leukotrienes: a new group of active compounds. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 6: 1-18, 1980.
- Samuelsson B., Dahlén S.E., Lindgren J.A., Rouzer C.A., and Serhan C.N.** Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. *Science* 237: 1171-6, 1987.
- Schetz M., Ferdinande P., Van de Berghe, Verwaest C., and Lauwers P.** Removal of pro-inflammatory cytokines with renal replacement therapy: sense or nonsense? *Intensive Care Med* 21: 169-76, 1995.

- Shaw J.O., Pinckard R.N., Ferrigni K.S., Mc Manus L.M., and Hanahan D.J.** Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (platelet-activating factor). *J Immunol* 127: 1250-5, 1981.
- Smith J.A.** Neutrophils, host defence, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56: 672-86, 1994.
- Smith R.J., Bowman B.J., and Iden S.S.** Stimulation of the neutrophil superoxide-anion-generating system with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. *Biochem Pharm* 33: 973-8, 1984.
- Sozzani P, Cambon C, Vita N, Seguelas MH, Caput D, Ferrara P, and Pipy B.** Interleukin-13 inhibits protein kinase C-triggered respiratory burst in human monocytes. Role of calcium and cyclic AMP. *J Biol Chem* 270(10):5084-8, 1995.
- Suttorp N., Polley M., Seybold J., Schnittler H., Seeger W., Grimminger F., and Aktories K.** ADP-Ribosylation of G-actin by botulinum C₂-toxin increases endothelial permeability in vitro. *J Clin Invest* 87: 1575-84, 1991.
- Suttorp N., Weber U., Welsch T., and Schudt C.** Role of Phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J Clin Invest* 91: 1421-8, 1993.
- Suttorp N., Hippenstiel S., Fuhrmann M., Krüll M., and Podzuweit T.** Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme II for reduction of endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol* 270: C778-85, 1996.
- Sweet M.J., and Hume D.A.** Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leuk Biol* 60: 8-26, 1996.
- Tobias P.S., and Ulevitch R.J.** Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in the lipopolysaccharide-dependent activation of cells. *Chest* 105: 48S-50S, 1994.
- Todd R.F., Arnaout M.A., Rosin R.E., Crowley C.A., Peters W.A., and Babior B.M.** Subcellular localization of the large subunit of Mo1 (Mo1 α ; formerly gp 110), a surface glycoprotein associated with neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 74: 1280, 1984.
- Tonnesen M.G.** Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *J Invest Dermatol* 93: 53S-8S, 1989.

- Walmrath D., Schneider T., Pilch J., Grimminger F., and Seeger W.** Aerosolized prostacyclin reduces pulmonary artery pressure and improves gas exchange in the adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Lancet* 342: 961-2, 1993.
- Walmrath D., Grimminger F., and Seeger W.** Perspektiven in der Behandlung des Akuten Respiratorischen Distress-Syndrom (ARDS). *Medwelt* 46: 414-21, 1995.
- Walmrath D., Schermuly R., Schneider T., Olschewski H., Grimminger F., and Seeger W.** Direct comparison of inhaled nitric oxide and aerosolized prostacyclin in ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 153(3): 991-6, 1996. [a]
- Walmrath D., Günther A., Ghofrani H.A., Schermuly R., Schneider T., Grimminger F., and Seeger W.** Bronchoscopic surfactant administration in severe adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Am J Respir Crit Care Med*.154(1): 57-62, 1996. [b]
- Weiss S.J., Klein R., Slivka A., and Wei M.** Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *J Clin Invest* 70(3): 598-607, 1982.
- Weiss S.J., Lampert M.B., and Test S.T.** Long-lived oxidants generated by human neutrophils: Characterization and bioactivity. *Science* 222: 625-8, 1983.
- Weiss S.J., Peppin G., Ortiz X., Ragsdale C., and Test S.T.** Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* 227: 747-9, 1985.
- Weiss S.J.** Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320: 365-76, 1989.
- Woods J.M., Katschke K.J., Tokuhira M., Kurata H., Arai K., Campbell P.L., and Koch A.E.** Reduction of inflammatory cytokines and prostaglandin E₂ by IL-13 gene therapy in rheumatoid arthritis synovium. *J. Immunol* 165: 2755-63, 2000.
- Yager D.R., and Nwomeh B.C.** The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 7: 433-41, 1999.
- Zaitso M, Hamasaki Y, Matsuo M, Kukita A, Tsuji K, Miyazaki M, Hayasaki R, Muro E, Yamamoto S, Kobayashi I, Ichimaru T, Kohashi O, and Miyazaki S.** New induction of leukotriene A₄ hydrolase by interleukin-4 and interleukin-13 in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 96 (2): 601-9, 2000.

- Zapol W.M., Riman S., Gillis N., Marletta M., and Bosken C.H.** Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 1375-80, 1994.
- Zhou H.L., Chabot-Flechter M., Foley J.J., Sarau H.M., Tzimas M.N., Winkler J.D., and Torphy T.J.** Association between leukotrien B₄-induced phospholipase D activation and degranulation of human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 46: 139-48, 1993.
- Ziegler E.J., McCutchan J.A., Fierer J., Glauser M.P., Sadoff J.C., Douglas H., and Braude A.I.** Treatment of gram-negative bacteraemia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*. *N Engl J Med* 307: 1225-30, 1982.
- Ziegler E.J., Fisher C.J. Jr., Sprung C.L., Straube R.C., Sadoff J.C., Foulke G.E., Wortel C.H., Fink M.P., Dellinger R.P., and Teng N.N.** Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 324: 429-36, 1991.
- Zimmermann G.A., Elstad M.R., Lorant D.E., McIntyre T.M., Prescott S.M., Topham M.K., Weyrich A.S., and Whatley R.E.** Platelet-activating factor (PAF): Signaling and adhesion in cell-cell-interaction. *Adv Exp Med Biol* 416: 297-304, 1996.

VIII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ARDS	Adult/Acute Respiratory Distress Syndrome
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Komplementfaktor, z.B. C5a
c-AMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Oberflächenmolekül, z.B. CD14 (Cluster of Differentiation)
c-GMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
coA	Coenzym A
DAG	Diacylglycerol
et al.	und andere
GDI	Guanin Nukleotid Austauschfaktor
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPC	Glycerophosphorylcholin
GTP	Guanosintriphosphat
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
Ig	Immunglobulin, z.B. IgG, IgE

INF γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IP	Inositol-Phosphat
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol/l, z.B. μ M, nM
MOF	Multiple Organ Failure
NO	Stickstoffmonoxid
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
p	Wahrscheinlichkeit (Possibility)
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	Phosphate buffered Saline, Standardpuffer
PC	Phosphatidyl-Cholin
phox	Phagocyte Oxidase
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMN	Neutrophile Granulozyten
PVA	Polyvinylalkohol
Rac2	low-molecular-mass GTP-binding protein; gefunden in PMN
Rap1A	low-molecular-weight GTP-binding protein
ROS	Reactive Oxygen Species
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-Like-Receptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha

VCAM

Vascular Cell Adhesion Molecule

2. Lebenslauf

Persönliche Information

- ▶ Name: Gunnar Manfred Pabst
- ▶ Geburtsdatum: 11. Juli 1970
- ▶ Geburtsort: Limburg / Lahn
- ▶ Familienstand: verheiratet

Berufserfahrung

01.2004 – 11.2004 Orthopädischer Registrar in der Abteilung für Orthopädie des Nambour General Hospitals in Nambour, Australien

03.2003 – 01.2004 Chirurgische Rotation sowie Rotationen in den Abteilungen Notfall Medizin, Anästhesie und Kardiologie als Resident Medical Officer des Townsville General Hospital in Townsville, Australien

06.2001 – 11.2002 Arzt im Praktikum in der Abteilung Orthopädie, Justus-Liebig-Universität, Giessen

1992 – 1993 Rettungssanitäter im Rettungsdienst und Krankentransport des Deutschen Roten Kreuzes in Weilburg

Famulatur

03.1996 – 04.1996 Innere Medizin / Asklepios Paulinen Klinik / Wiesbaden

03.1997 – 04.1997 Innere Medizin / Justus-Liebig-Universität / Giessen

09.1997 Chirurgie / Kreiskrankenhaus / Schotten

03.1998 Orthopädie-Praxis / Schick / Mainz

Hochschulausbildung

10.1993 – 06.2000 Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen

04.1999 – 03.2000 Praktische Jahr

04.1999 – 08.1999 1. Terial am Mayo General Hospital (National University of Ireland) in Castlebar / Innere Medizin

08.1999 – 12.1999 2. Terial an der Justus-Liebig-Universität Giessen / Chirurgie

	12.1999 – 03.2000 3. Terial am Merlin Park Hospital (National University of Ireland) in Galway / Orthopädie
Zivildienst	10.1990 – 12.1991 Rettungssanitäter im Rettungsdienst und Krankentransport des Deutschen Roten Kreuzes in Weilburg
Schulischer Werdegang	1981 – 1990 Tilemann-Gymnasium Limburg / Abitur
Fortbildung	Erster Abschnitt des Strahlenschutzkurses Erlangung des Nachweises “Fachkunde Rettungsdienst“ der Arbeitsgemeinschaft Intensiv Medizin in Arnsberg
Weitere Qualifikation	Sprachen: Englisch EDV-Kenntnisse: Windows, Microsoft Office, Plot-IT, Photoshop
Interessen	Sport: Badminton, Ausdauersportarten, Inline-Skating Möbel Restauration, Fotografie

3. Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr W. Seeger und Herrn Prof. Dr. Dr. F. Grimminger für das interessante Promotionsthema und, daß sie mir die Möglichkeit gegeben haben, in ihrer Forschungsgruppe unter ausgezeichneten Bedingungen zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. K. Mayer, der durch seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung, sein unablässiges Interesse, seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein umfangreiches medizinisches und naturwissenschaftliches Wissen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Karin Fietzner und Annette Tschuschner sei ein herzliches Dankeschön für ihre unterstützende und fördernde Zusammenarbeit.

Ein ausgesprochener Dank gilt Dr. S. Gokorsch, die mit viel Enthusiasmus meine Einarbeitung in die Durchführung analytischer Verfahren übernommen hat und generell meine Arbeit im Labor mit viel Einsatz betreute.

Bedanken möchte ich mich bei Annett Lühken für ihre kritische Korrektur und ihre Anregungen.

Meinen Eltern danke ich für ihre ausgesprochene Verlässlichkeit, ihr großes Vertrauen, ihre großartige Unterstützung und ihre Liebe, wodurch sie meine Ausbildung ermöglicht haben.

4. Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Selters, den 29. November 2004