

**Untersuchungen zur Interaktion von humanen
polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und
inflammatorisch vorbehandelten intestinalen Epithelzellen
am Beispiel von CaCo-2B-Zellen**

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

vorgelegt von Neumann, Petra
aus Rodewisch/Vogtland

Giessen 2010

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. K. Mayer

Gutachter: Prof. Dr. J. Meyle

Tag der Disputation: 13.12.2011

Meinen Eltern

Ursula und Siegfried Neumann

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	I
1.1. Vorwort	I
1.2. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	I
1.2.1. Ätiologie und Pathogenese der CED	I
1.2.2. Genetische Prädisposition	I
1.2.3. Mikrobielle und infektiöse Faktoren	I
1.2.4. Physiologische Hyporeaktivität des mukosalen Immunsystems	I
1.2.5. Aktivierung des mukosalen Immunsystems bei CED	I
1.2.6. Zelluläre Komponenten des mukosalen Immunsystems	I
1.2.6.1. Epithelzellen	I
1.2.6.2. Makrophagen	I
1.2.6.3. T-Lymphozyten	I
1.2.7. Zytokinvermittelte Apoptoseresistenz von T-Zellen	I
1.3. Zytokin- und Chemokinexpression bei CED	I
1.3.1. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	I
1.3.2. Interleukin-8 (IL-8)	I
1.4. Eicosanoide	I
1.4.1. Übersicht	I
1.4.2. Lipoxygenase-Produkte der Arachidonsäure	I
1.4.2.1. 5-Lipoxygenase-Metabolismus	I
1.5. Stickstoffmonoxid (NO)	I
1.5.1. NO-Synthese	I
1.5.2. NO-Synthasen	I
1.5.2.1. konstitutive NO-Synthase – cNOS (NOS I, III)	I
1.5.2.2. induzierbare NO-Synthase - iNOS (NOS II)	I
1.5.3. NO-Metabolismus	I
1.5.4. NO und Inflammation	16
1.5.5. NO und chronisch entzündliche Darmerkrankungen	17
1.6. Neutrophile Granulozyten	I

1.6.1. Bildung von Sauerstoffradikalen – <i>respiratory burst</i>	I
1.6.2. Granulozytäre Enzyme.....	I
1.6.2.1. Primäre Granula	20
1.6.2.2. Sekundäre Granula	20
1.6.2.3. Tertiäre Granula	21
1.7. CaCo-2B-Zellen als Modell	I
1.8. Fragestellung.....	I
2. MATERIAL UND METHODEN	I
2.1. Materialien	I
2.1.1. Experimentelle Agenzien.....	I
2.1.1.1. Einzelsubstanzen	I
2.1.1.2. Lösungen/Puffer	I
2.1.2. Medien und Agenzien für PMN-Isolation und Zellkultur	I
2.1.2.1. Einzelsubstanzen	I
2.1.2.2. Lösungen	I
2.1.2.3. Zellkulturmaterial.....	I
2.1.3. ELISA-Materialien	I
2.1.3.1. Substanzen für Puffer/Diluent.....	27
2.1.3.2. Puffer.....	28
2.1.3.3. Standards und Antikörper	28
2.1.3.4. Assay-Substanzen	29
2.1.3.5. Materialien	29
2.1.4. Agenzien und Materialien für die NO-Messung.....	I
2.1.4.1. Einzelsubstanzen	29
2.1.4.2. Lösungen	29
2.1.4.3. Materialien	30
2.1.5. HPLC-Materialien.....	I
2.1.5.1. authentische Standards	30
2.1.5.2. Lösungsmittel.....	30
2.1.5.3. Säulenmaterial und Vorsäulen	31
2.1.6. Geräte.....	I

2.2. Methodik	I
2.2.1. Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten	I
2.2.2. Erfassung granulozytärer Funktionsparameter	33
2.2.2.1. Degranulierung.....	33
2.2.2.2. Bildung von Sauerstoffradikalen - <i>respiratory burst</i>	34
2.2.3. Enzymo-linked-immuno-sorbens-Assay (ELISA)	35
2.2.3.1. Prinzip: ELISA.....	35
2.2.3.2. Durchführung	36
2.2.4. Erfassung oxidativer Endprodukte des NO	37
2.2.4.1. Prinzip	37
2.2.4.2. Aufbau des Chemilumineszenzdetektors	38
2.2.4.3. Deproteinierung der Proben	39
2.2.4.4. Versuchsablauf.....	39
2.2.5. Analytik der Arachidonsäure-Metaboliten	40
2.2.5.1. Festphasenextraktion.....	40
2.2.5.2. HPLC-Analytik	41
2.2.6. Kultivierung der CaCo-2 Zellen	43
2.2.7. Experimentelles Protokoll.....	44
2.2.7.1. Vorbehandlung der CaCo-2 Zellen	44
2.2.7.2. Versuchsablauf.....	44
2.2.8. Statistik	45
3. ERGEBNISSE	46
3.1. Übersicht	46
3.2. Verminderung destruktiver granulozytärer Zellreaktionen durch TNFα-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen	47
3.3. Suppression destruktiver granulozytärer Zellreaktionen durch Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit TNFα, IL-1β und IFNγ	49
3.4. Einfluss der Zytokine TNFα, IL-1β und IFNγ auf die MCP-1- und IL-8-Synthese in CaCo-2B-Zellen	51
3.5. Untersuchung zum Einfluss der Zytokine TNFα, IL-1β und IFNγ auf die NO-Synthese in CaCo-2B-Zellen	53

3.6. Suppression destruktiver granulozytärer Zellreaktionen durch LPS-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen	55
3.7. Einfluss von LPS auf die Synthese von MCP-1 und IL-8 in CaCo-2B-Zellen.....	57
3.8. Untersuchung zum Einfluss von LPS auf die NO-Synthese in CaCo-2B-Zellen.....	59
3.9. Untersuchung zur Induzierbarkeit der ecNOS-Proteinsynthese in CaCo-2B-Zellen durch Inkubation mit TNFα, IL-1β, IFNγ bzw. mit LPS.....	60
3.10. Untersuchungen zum Einfluss nativer und Zytokin-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen auf den granulozytären 5-Lipoxygenase-Metabolismus	60
3.11. Untersuchungen zum Einfluss LPS-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen auf die granulozytäre Leukotriensynthese	64
4. DISKUSSION	66
4.1. Synthese proinflammatorischer Mediatoren in CaCo-2B-Zellen.....	67
4.2. Modulation der granulozytären Sauerstoffradikalfreisetzung durch NO.....	68
4.3. Hypothesen zur NO-vermittelten Suppression der destruktiven granulozytären Reaktionen	69
4.4. Phospholipasen A₂ - zentrale Enzyme der Eicosanoidsynthese.....	71
4.5. Kooperative Eicosanoidsynthese - hypothetischer Mechanismus der LPS-induzierten Amplifizierung der granulozytären Leukotriensynthese.....	73
4.6 Ausblick.....	75
4.7 Zusammenfassung - Summary.....	76
5. LITERATURVERZEICHNIS	79
6. ABKÜRZUNGEN	101
7. DANKSAGUNG	103

1. Einleitung

1.1. Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 1999 bis Mai 2000 unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. K. Mayer im Laborbereich von Herrn Prof. Dr. Dr. F. Grimminger in der klinischen Forschergruppe "Respiratorische Insuffizienz" im Rahmen des Sonderforschungsbereiches „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Seeger. Die Experimente untersuchten den Einfluss des Darmepithels, am Modell von CaCo-2B-Zellen, auf die inflammatorische Aktivität von neutrophilen Granulozyten. Hierbei standen die Auswirkungen auf die Bildung von Sauerstoffradikalen (*respiratory burst*) und die Elastasefreisetzung der Granulozyten im Mittelpunkt. Für die Experimente wurden die CaCo-2B-Zellen mit proinflammatorischen Mediatoren vorbehandelt. Über das eigentliche Promotionsthema hinaus war die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) sowie der Zytokine Interleukin-8 (IL-8) und Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) durch die inflammatorisch vorbehandelten CaCo-2B-Zellen ein weiterer Schwerpunkt meiner Untersuchungen. Des Weiteren wurde überprüft, ob native bzw. inflammatorisch vorbehandelte CaCo-2-Zellen die granulozytäre Leukotriensynthese modulieren können.

1.2. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Der Morbus Crohn (M. Crohn) und die Colitis ulcerosa gehören zum Formenkreis der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), deren Ätiologie bis heute immer noch unzureichend geklärt ist (1,2). Der M. Crohn ist eine granulomatöse transmurale Entzündung des gesamten Intestinaltraktes, mit bevorzugter Lokalisation im terminalen Ileum. Charakteristisch sind ein diskontinuierlicher Entzündungsprozess mit fissuralen Darmwandläsionen sowie die Einbeziehung regionaler Mesenteriallymphknoten in das Entzündungsgeschehen. Komplizierend können chronische Fisteln, Abszesse sowie Darmwandperforationen hinzutreten. Der M. Crohn hat in Deutschland eine Inzidenz von 0,5 - 6,3/100.000 Einwohner und zeigt einen Altersgipfel in der 2. und einen in der 5. Lebensdekade (1,2).

Die Colitis ulcerosa ist dagegen eine vom Rektum ausgehende, ascendierende Entzündung des Colons. In sehr ausgeprägten Fällen ist eine Beteiligung des terminalen Ileums möglich. Das histopathologische Korrelat sind oberflächliche Schleimhautulzerationen,

Kryptenabzesse und Pseudopolypen. Im fortgeschrittenen Stadium ist eine Schleimhautabflachung und Becherzellverarmung charakteristisch. Typische Komplikationen sind Strikturen, Fisteln und das toxische Megakolon (3). Die Inzidenz liegt in Deutschland bei 1,5 - 15,1/100.000 Einwohner. Klinisch geben Betroffene bei beiden Erkrankungen eine chronisch-rezidivierende Diarrhöe, Fieber, Gewichtsverlust und Abdominalschmerzen an (1-3).

Sowohl beim M. Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa können extraintestinale Begleiterkrankungen der Augen (Uveitis), der Haut (Erythema nodosum) und des Skelettsystems (Arthritis) auftreten. Weiterhin ist für beide Erkrankungen ein deutlich erhöhtes Karzinomrisiko nach langem Krankheitsverlauf charakteristisch (3,4).

1.2.1. Ätiologie und Pathogenese der CED

Die Ätiologie des M. Crohn und der Colitis ulcerosa sind auch noch heute nur unzureichend geklärt. Wahrscheinlich ist weder ein bestimmtes Agens noch ein bestimmter Gendefekt allein verantwortlich, sondern eine Vielzahl verschiedener Einflüsse und Defekte führen zur Ausprägung des klinischen Phänotyps M. Crohn/Colitis ulcerosa. Die CED-Forschung der letzten Jahre hat neue Erkenntnisse über eine gestörte Regulation von Zytokinen in der intestinalen Mukosa erbracht (5). Neue und zukünftige therapeutische Ansätze basieren deshalb u.a. auf einer gezielten Modulation dieses Zytokinnetzwerkes. Die Ausprägung einer CED wird durch genetische Faktoren, Umweltfaktoren sowie auch durch die lokale Darmflora beeinflusst (2,6).

1.2.2. Genetische Prädisposition

Durch Kopplungsanalysen konnten mehrere Suszeptibilitätsregionen für CED auf den Chromosomen 3, 7, 12 und 16 identifiziert werden (7). Im Jahr 2001 wurde auf Chromosom 16q12 das sogenannte NOD²-Gen identifiziert (nach neuer Nomenklatur CARD 15), das bei einer Subgruppe von M. Crohn-Patienten Mutationen trägt. Das Gen ist hinsichtlich der mukosalen Zytokinmodulation von Bedeutung. Es wird unter anderem in Monozyten exprimiert (8). NOD² reguliert in diesen Zellen die LPS-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκ-B (Nukleärer Faktor κ-B), einem Schlüsselfaktor in der Pathogenese des M. Crohn (9). NFκ-B steuert die transkriptionelle Regulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8, des Tumor-Nekrosefaktors-α (TNFα) sowie auch der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) (10). Nach Aktivierung transloziert

NF κ -B in den Zellkern und bindet dort an spezifische DNA-Bindungsstellen in der Promotorregion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF α . Bei M Crohn-Patienten mit Mutationen im NOD²-Gen fehlt möglicherweise im Initialstadium der intestinalen Entzündung die NOD²-induzierte NF κ -B-Aktivierung, die zur Eliminierung bakterieller Infektionen beitragen kann. Dies könnte dann wiederum eine perpetuierte Aktivierung des mukosalen Immunsystems zur Folge haben (11). Alle bis jetzt vorliegenden Daten untermauern die Hypothese, dass eine genetische Prädisposition zur Aktivierung des intestinalen Immunsystems durch bakterielle Antigene oder bakterielle Produkte eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des M Crohn spielt.

Bei der Colitis ulcerosa geht man von einer potenziellen autoimmunologischen Genese der Erkrankung aus. Neben der wiederholt beobachteten Assoziation mit bestimmten HLA-Klasse II Strukturen, der Organspezifität und der Assoziation mit der primär sklerosierenden Cholangitis, stützt die hohe Prävalenz verschiedener Autoantikörper einschließlich pANCA diese These (3,4,12). Es könnte sein, dass eine Kreuzreaktivität durch molekulare Mimikri von körperfremden und körpereigenen Antigenen bei der Colitis ulcerosa pathophysiologisch von Bedeutung ist, wodurch nachfolgend Immunreaktionen gegenüber der natürlichen Darmflora entstehen (13).

1.2.3. Mikrobielle und infektiöse Faktoren

Sowohl für den M. Crohn als auch für die Colitis ulcerosa gibt es direkte und indirekte Hinweise für eine pathogenetische Rolle mikrobieller Faktoren (3,4). Hierfür spricht u.a. die häufige Manifestation in Darmarealen mit der höchsten Bakterienkonzentration. Wiederholt wurde versucht, spezifische Bakterien oder Viren als kausale Krankheitserreger bei CED zu identifizieren, bislang jedoch ohne Erfolg. Beim M. Crohn wurde beispielsweise eine Infektion mit Mycobacterium paratuberculosis oder Masernviren als Krankheitsauslöser diskutiert, der eindeutige Beweis für diese Hypothese fehlt jedoch (2). Ein geringer Hygienestatus mit häufigen Infektionen im Kindesalter scheint vor dem Entstehen der Erkrankung zu schützen (14).

Untersuchungen zeigten, dass die Darmflora beim M. Crohn in ihrer Zusammensetzung verändert ist. Neben einer Erhöhung der intestinalen Bakterienkonzentration kommt es hierbei v.a. zu einem vermehrten Eindringen von Bakterien in die Mukosa (6,15). Begünstigend hierfür ist eine intestinale Barrierestörung (16). Umstritten ist, ob diese sekundär durch die intestinale Entzündungsreaktion entsteht oder ein kausaler, primärer

pathogenetischer Faktor ist. Des Weiteren konnte aufgezeigt werden, dass die physiologische Toleranz des mukosalen Immunsystems gegenüber der autologen Flora des Darmes bei CED-Patienten gestört ist (17).

1.2.4. Physiologische Hyporeaktivität des mukosalen Immunsystems

Beim Gesunden zeigt das Immunsystem des Darmes einen relativ niedrigen Aktivitätszustand. So befinden sich auf der Oberfläche von intestinalen Makrophagen weniger co-stimulatorische Moleküle für die T-Zell-Aktivierung als auf Makrophagen aus dem peripheren Blut (13). Die Lamina propria-T-Zellen sind im Vergleich zu T-Zellen des peripheren Immunsystems schlechter über den CD3-Rezeptor zu stimulieren (18). Des Weiteren werden große Mengen der antiinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-10 und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) produziert (19). Ein weiteres Charakteristikum der T-Zellen der Lamina propria ist ihre physiologischerweise deutlich erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu T-Zellen aus dem peripheren Immunsystem. Dies beinhaltet die erhöhte Bereitschaft, nach Aktivierung durch einen programmierten Zelltod zu sterben (20). Die Folge ist eine Limitierung der intestinalen Immunreaktion.

Diese Befunde sind eine Erklärung für die physiologische "Hyporeagibilität" des mukosalen Immunsystems und sprechen für eine strenge Selektion von Antigenen, gegen die intestinale Immunreaktionen unter physiologischen Bedingungen generiert werden.

1.2.5. Aktivierung des mukosalen Immunsystems bei CED

Bei CED ist die Homöostase des intestinalen Immunsystems gestört (21,22). Im intestinalen Immunsystem des Gesunden dominieren antiinflammatorische gegenüber proinflammatorischen Zytokinen. Daran sind sehr wahrscheinlich dendritische Zellen, die transepithelial parazellulär bakterielle Antigene aus dem Darmlumen aufnehmen und an T-Zellen präsentieren, zentral beteiligt. Dieser Mechanismus soll die vermehrte Bildung antiinflammatorisch wirkender Zytokine wie IL-10 und TGF- β vermitteln, die ihrerseits T-Zellen und Makrophagen in der Lamina propria hemmen (22).

Beim M. Crohn generieren T-Lymphozyten spezifische proinflammatorische Immunantworten gegenüber bakteriellen Antigenen. Eine wichtige Rolle übernimmt hierbei IL-12, das von Antigen-präsentierenden Zellen sezerniert wird. IL-12 bewirkt in den antigenstimulierten T-Lymphozyten eine Aktivierung der Gene, die die proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und Interferon- γ (INF γ) codieren. Durch

diesen Mechanismus entstehen Effektor-T-Zellen, die bei erneutem Antigenkontakt diese proinflammatorischen Zytokine in großer Menge produzieren (23).

Für die Colitis ulcerosa ist die Immunpathogenese weniger gut untersucht. Es scheinen jedoch T-Zell-Antworten generiert zu werden, die zu einer Aktivierung des humoralen Immunsystems führen (22).

Als gemeinsame Endstrecke kommt es zytokinvermittelt zur T-Zellproliferation und zur Makrophagen- und Granulozytenaktivierung in der Darmmukosa. Über die Freisetzung chemotaktischer Substanzen wird die Rekrutierung zirkulierender Leukozyten in die Mukosa gefördert. Die Synthese zytotoxischer Substanzen führt zur Schädigung des intestinalen Epithels mit nachfolgendem Verlust der mukosalen Barrierefunktion für bakterielle Antigene. Diese Antigene können wiederum eine chronische Stimulation des intestinalen Immunsystems auslösen (24).

Trotz nachweislich zentraler pathogenetischer Rolle des aktivierten intestinalen Immunsystems bei CED sind aber die Faktoren noch weitgehend unklar, die den Prädilektionsbefall des terminalen Ileums beim M.Crohn sowie des Rektums und des Colons bei der Colitis ulcerosa bedingen (22).

1.2.6. Zelluläre Komponenten des mukosalen Immunsystems

1.2.6.1. Epithelzellen

Neben Barriere- und Transportfunktion spielen die Epithelzellen eine aktive Rolle im intestinalen Immunsystem. Hierbei scheinen Epithelzellen mit inerten und potenziell pathogenen Antigenen aus der Darmflora und der Nahrung zu interagieren (25). Darmepithelzellen können selbst zahlreiche Zytokine, NO und Leukotriene produzieren, die Granulozyten anlocken und die inflammatorische Reaktion mit nachfolgender Gewebsdestruktion unterhalten (26-28).

1.2.6.2. Makrophagen

Die Makrophagen der Lamina propria sind in der Lage, Antigene zu präsentieren und eine Reihe proinflammatorischer Zytokine zu produzieren, wie beispielsweise IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 und TNF α . Diese von Makrophagen synthetisierten Zytokine weisen spezifisch pathologisch veränderte Expressionsmuster bei CED auf (22,29).

1.2.6.3. T-Lymphozyten

CD4⁺-T-Lymphozyten (T-Helfer-Lymphozyten) befinden sich organisiert in den Peyer'schen-Plaques im Dünndarm und diffus verteilt in der Lamina propria. Sie können nach Antigenpräsentation und Co-Stimulation pro- und antiinflammatorisch wirksame Zytokine produzieren, die modulierend auf das inflammatorische Geschehen einwirken (1,2,11,22). Nach dem von ihnen produzierten Zytokinprofil ist eine Einteilung in mehrere Gruppen von T-Helferzellen möglich: Typ-1-Helferzellen (T_h1) und Typ-2-Helferzellen (T_h2) produzieren unterschiedliche Spektren v.a. proinflammatorischer Zytokine (T_h1 → INF γ , TNF α ; T_h2 → IL-4, IL-5) (22). Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und Typ-3-Helferzellen (T_h3) sezernieren vorwiegend antiinflammatorisch wirksame Zytokine (T_{reg} → IL-10; T_h3 → TGF- β) (22).

Im Intestinaltrakt eines Gesunden werden über unreife dendritische Zellen vorwiegend T_{reg} und T_h3-Antworten initiiert, die zur Suppression von Immunantworten und zur Toleranzentwicklung beitragen. Bei CED kommt es dagegen zur Aktivierung proinflammatorischer Zytokinprofile von T-Helferzellen, die den intestinalen Entzündungsprozess weiter stimulieren (30).

1.2.7. Zytokinvermittelte Apoptoseresistenz von T-Zellen

Im Intestinaltrakt ist das Immunsystem vor einer unkontrollierten Immunantwort und überschießender klonaler Expansion der mukosalen T-Zellen geschützt. Ein Mechanismus, der zur Limitierung der mukosalen Immunantwort beiträgt, ist die Induktion des programmierten Zelltodes, der Apoptose, von T-Zellen, die im entzündeten Darm gestört ist (1,2,11,22). Dadurch kommt es zur Akkumulation von T-Zellen in der Lamina propria, die mit zur Perpetuierung und Chronifizierung der Entzündungsreaktion beiträgt. Dieses Phänomen gilt mit als einer der Pathomechanismen des M. Crohn (31,32). IL-6, das beim M.Crohn von Makrophagen und T-Zellen vermehrt sezerniert wird, vermittelt über bestimmte Rezeptoren die Expression antiapoptotischer Faktoren (33). Ebenso ist TNF α über einen bislang noch nicht geklärten Mechanismus an der Vermittlung der Apoptoseresistenz von T-Zellen beteiligt (11).

1.3. Zytokin- und Chemokinexpression bei CED

CED sind u.a. dadurch charakterisiert, dass betroffene Darmabschnitte mit Entzündungszellen infiltriert sind. Vermittelt wird dieser Zelleinstrom hauptsächlich durch Chemokine, eine Gruppe von Botenstoffen, denen man eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von CED zuschreibt (11,26,34).

Zu den Chemokinen zählen gegenwärtig mehr als 70 Proteine, 8 - 10 kD schwer, mit einer Aminosäure-Sequenzhomologie von 20 - 70 %. Sie werden aufgrund ihrer Struktur in zwei Hauptgruppen unterteilt: α - oder C-X-C- und β - oder C-C-Chemokine. Grundlage für diese Unterteilung ist die Anwesenheit einer zusätzlichen Aminosäure (α -Chemokine), die die ersten beiden Cysteinmoleküle der Aminosäurekette trennt (24,35,36). Dieser strukturelle Unterschied ist bedeutend, denn er ist verbunden mit der Fähigkeit der Chemokine, spezifisch mit einzelnen Leukozytensubpopulationen zu interagieren. α -Chemokine, mit IL-8 als Prototyp, binden bevorzugt an neutrophile Granulozyten, während β -Chemokine, mit MCP-1 als Prototyp, v.a. mit Monozyten/Makrophagen aber auch mit Lymphozyten und Mastzellen interagieren (37).

Chemokine werden von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen wie Monozyten, neutrophile Granulozyten, Mesangialzellen und Endothelzellen synthetisiert (35).

Die Sekretion von Chemokinen ist in ruhenden Zellen sehr gering, kann aber im Rahmen einer Entzündung, eines Traumas oder einer Ischämie rapide gesteigert werden (35). Typischerweise wird diese durch proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 β , INF γ aber auch durch Endotoxin (LPS), reaktive Sauerstoffspezies und durch Stickstoffmonoxid (NO) induziert. Andere Zytokine wie IL-10, IL-4, TGF- β hemmen dagegen die Chemokinsekretion (35,38-40).

Chemokine vermitteln ihre Wirkung durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Auf der cytosolischen Seite sind diese an G-Proteine gekoppelt, sodass die intrazelluläre Signaltransduktion nach Aktivierung des Rezeptors durch G-Protein-abhängige Mechanismen resultiert. Fünf Rezeptoren für C-X-C-Chemokine und acht Rezeptoren für C-C-Chemokine sind bis jetzt charakterisiert (37). Die Majorität der Rezeptoren erkennt mehr als ein Chemokin. Mehrere Chemokine können an mehr als einen Rezeptor binden. Diese Vielseitigkeit ist charakteristisch für das Chemokinsystem. Eine Einschränkung besteht jedoch. C-X-C- und C-C-Chemokinrezeptoren interagieren nur mit Liganden aus der korrespondierenden Chemokinsubfamilie (37,41).

Die Fähigkeit der Chemokine, die Leukozytenmigration (Chemotaxis) zu initiieren, ist eine ihrer grundlegenden Funktionen. Der erste Schritt besteht in der Aktivierung von

Integrinen, spezielle leukozytäre Oberflächenmoleküle, die die Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen und die extrazelluläre Matrix vermitteln. Im zweiten Schritt wird die Transmigration der adhärenen Leukozyten durch das Endothel und die extrazelluläre Matrix begünstigt (36,42,43). Die Chemokine sind hierfür an die Proteoglykane des Endothels und des subendothelialen Gewebes fixiert, und stellen so „immobilisierte Substrate“ für die Zielzellen dar (44,45).

Es hat sich gezeigt, dass Chemokine das Wachstum und die Differenzierung hämatopoetischer Zellen beeinflussen (24,46). Ein analoger Effekt auf ein oder mehrere Zelltypen der intestinalen Mukosa und des lymphatischen Systems wäre denkbar. Chemokine sind an der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen u.a. aus dem autoimmunologischen Formenkreis wie den CED, der rheumatoiden Arthritis, sowie allergischen Lungenerkrankungen und Gefäßerkrankungen beteiligt (47-50). Chemokine spielen eine bedeutende Rolle im Rahmen der akuten Infektionsabwehr. In diesem Zusammenhang wurde eine rasche Induktion der Sekretion bestimmter Chemokine in mehreren Tiermodellen als auch klinischen Studien gefunden (47).

Im Stadium der chronischen Inflammation, so auch bei CED, sind Chemokine zentral an der kontinuierlichen Infiltration der Mukosa mit Entzündungszellen beteiligt (24,26,34,47,50,51). Vermittelt wird dies wie bei akuten inflammatorischen Abläufen über die Induktion der Chemotaxis der Leukozyten ins betroffene Gewebe und der anschließenden Aktivierung dieser Zellen (35,37,42,52). Mehrere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass die Zellen der intestinalen Mukosa von Patienten mit CED eine große Fülle von Chemokinen und Zytokinen mit separater und auch überlappender Funktion verstärkt exprimieren. Die Studien beschränkten sich meistens auf die beiden relativ gut charakterisierten Chemokine IL-8 und MCP-1 und Zytokine wie u.a. $TNF\alpha$, $INF\gamma$, IL-6, IL-4. Dabei ließen sich signifikant höhere Konzentrationen von MCP-1 und IL-8 in der intestinalen Mukosa bei CED im Vergleich zu gesunder Mukosa nachweisen (24,46,53-55). Hier fanden sich die untersuchten Chemokine in weitaus geringeren Konzentrationen. Derzeit nimmt man an, dass diese „low level“ Chemokinsekretion physiologische und homöostatische Aufgaben erfüllt (24). Der Faktor, der zu der pathologischen Steigerung der physiologischen Chemokinsekretion führt, ist bislang noch unbekannt.

1.3.1. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)

Das Monozyten-Makrophagen-System spielt eine wichtige Rolle im Rahmen akuter und chronischer Entzündungsreaktionen. Monozyten werden im Knochenmark gebildet, wandern nach einer kurzen Passagezeit im Blut ins periphere Gewebe aus und wandeln sich hier zu ortsständigen Gewebemakrophagen um (56).

MCP-1 ist ein proinflammatorisch wirkendes Chemokin, das die Chemotaxis der Monozyten aus dem peripheren Blut stimuliert. MCP-1 ist spezifisch für Monozyten. Lymphozyten und neutrophile Granulozyten haben keine hohe Bindungsaffinität zu MCP-1 (57,58). Eine Vielzahl von Zellarten, darunter auch maligne Zellen, wie z.B. Melanomzellen, exprimieren MCP-1 konstitutionell oder unter inflammatorischer Stimulation (56,59,60).

MCP-1 stimuliert in den Monozyten die Expression spezifischer Rezeptoren, die für die Adhäsion am Endothel und die nachfolgende Migration durch das Gewebe in Richtung Entzündungsherd essenziell sind (56). Zusätzlich kommt es MCP-1-induziert zu einer Zunahme des Calciumeinstromes in die Monozyten und nachfolgend zur Aktivierung der Bildung von Sauerstoffradikalen (*respiratory burst*), der Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und IL-6 und der Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten (56,61). Die TNF α -Sekretion der Monozyten wird dagegen nicht durch MCP-1 beeinflusst (56).

MCP-1 aktiviert die Monozyten-vermittelte Hemmung von Tumorwachstum *in vivo* und auch *in vitro*. Dies geschieht zum einen über die Regulation monozytärer Oberflächenmoleküle, zum anderen werden tumorizide Reaktionen durch die monozytären Zytokine IL-1 und IL-6 moduliert (62,63).

MCP-1 spielt eine bedeutende Rolle in der zellulären Immunabwehr und in der Reaktion des Organismus auf eine akute Gewebeschädigung (*acute tissue injury*) (35,47). Des Weiteren hat MCP-1 eine wichtige Funktion im Rahmen chronischer Erkrankungen. Es ist beispielsweise in atheromatösen Plaques, in der Synovialflüssigkeit von Gelenken im Rahmen rheumatischer Erkrankungen sowie in der Mukosa bei CED in großen Mengen nachweisbar (34,48,49,54,64,65).

1.3.2. Interleukin-8 (IL-8)

IL-8 gehört zu den α -Chemokinen. Es kann nach entsprechender Stimulation von vielen verschiedenen Zelltypen, v.a. von Monozyten und Makrophagen gebildet werden. Sehr

potente Stimulatoren sind die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β , aber auch Endotoxin und Stickstoffmonoxid (40,42,66).

Neben den bekannten neutrophilen chemotaktischen Substanzen wie Plättchenaktivierender Faktor (PAF), Leukotrien B₄ (LTB₄), Komplementfaktor 5a (C5a) ist IL-8 der stärkste und selektivste Aktivator neutrophiler Granulozyten (35). Das Wirkungsspektrum von IL-8 an den Zielzellen umfasst die Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche, die Aktivierung des Zytoskeletts für die Migration der Zellen, die Freisetzung gespeicherter Enzyme und die Induktion der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (37).

Die Hauptaufgabe von IL-8 ist, die Migration und anschließende Aktivierung von neutrophilen Granulozyten aus der Zirkulation in Ischämie- bzw. Entzündungsgebiete zu fördern. Eine Schlüsselrolle spielt dabei mit großer Wahrscheinlichkeit das Endothel der Venen und Venolen. Hier wird nach Stimulation durch IL-1 β und TNF α IL-8 als Chemokin zur Förderung der Chemotaxis freigesetzt (39,67). IL-8 persistiert in aktiver Form lange im Gewebe, was seine prolongierte Wirkung erklärt (68).

IL-8 wird eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CED und anderer Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis zugeschrieben (34,48,50). IL-8 ist auch an der Pathogenese des ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) der Lungenfibrose und von Gefäßerkrankungen beteiligt (49,66).

1.4. Eicosanoide

1.4.1. Übersicht

Eicosanoide sind pro- und antiinflammatorische Lipidmediatoren, die von unterschiedlichen Zelltypen synthetisiert werden können. Sie sind in der Lage, eine Vielzahl immunologischer Reaktionen zu induzieren (69). Ausgangssubstanz ist die Arachidonsäure (AA), eine 4-fach ungesättigte C20-Fettsäure, die in Membranlipiden in veresterter Form vorliegt. Die Freisetzung dieser Eicosanoid-Vorstufe wird durch Calcium-abhängige Aktivierung einer oder mehrerer Phospholipase A₂-Subtypen gesteuert (69,70). In PMN stellt das Membranlipid Phosphatidylcholin die endogene Hauptquelle für freie Arachidonsäure dar. Des Weiteren besitzen neutrophile Granulozyten die Fähigkeit, exogen angebotene Arachidonsäure zu metabolisieren, wobei *in vivo* unter inflammatorischen Bedingungen verschiedene Zellarten wie Endothelzellen und Alveolarmakrophagen als Arachidonsäure-Donatoren fungieren können. Dieses Prinzip

wird als kooperative Leukotriensynthese beschrieben und wurde schon wiederholt in Co-Kulturen zweier verschiedener Zellenarten untersucht (71,72).

Freie Arachidonsäure kann grundsätzlich über verschiedene Oxygenase-Systeme verstoffwechselt werden. Die Aktivierung des Cyclooxygenaseweges mündet in der Synthese von Prostaglandinen und Thromboxan A₂. Die Metabolisierung durch die Lipoxygenasen führt zur Bildung von Leukotrienen, Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE) und Lipoxinen (69,70).

1.4.2. Lipoxygenase-Produkte der Arachidonsäure

Lipoxygenasen (LO) katalysieren den Einbau eines Sauerstoffmoleküls über Dioxygenierung der Arachidonsäure. In Abhängigkeit davon, an welchem C-Atom die Sauerstoff-Addition erfolgt, differenziert man 5-, 12-, 15-Lipoxygenasen. PMN besitzen hauptsächlich 5-Lipoxygenase-Aktivität (73).

1.4.2.1. 5-Lipoxygenase-Metabolismus

Der erste Schritt der Synthese von 5-LO-Produkten besteht in der enzymatisch katalysierten spezifischen Dioxygenierung der Arachidonsäure am 5. Kohlenstoffatom. Aus dem dabei gebildeten instabilen Hydroxyperoxid (5-HPETE) leiten sich unterschiedliche Substanzklassen ab. Durch eine Peroxidase katalysiert, kann 5-HPETE in die entsprechende Monohydroxyfettsäure (5-HETE) umgewandelt werden. Außerdem kann aus 5-HPETE, erneut 5-LO-katalysiert, das labile Epoxid Leukotrien A₄ (LTA₄) entstehen. Aus diesen Intermediaten können, je nach zellspezifischer Enzymausstattung, zwei Substanzklassen entstehen. Zum einen kann durch die LTA₄-Hydrolase Leukotrien B₄ (LTB₄) synthetisiert werden, das über eine Cytochrom-P450-abhängige Omega-Oxidation zu den Metaboliten 20-hydroxy- und 20-carboxy-LTB₄ abgebaut wird. Andererseits können aus LTA₄, durch eine Glutathion-Peroxidase katalysiert, enzymatisch LTC₄, LTD₄ und LTE₄ gebildet werden. LTA₄ kann außerdem spontan zu den metabolisch inaktiven Diastereomeren des 6-trans-LTB₄ und des 5,6-di-HETE zerfallen (69,70,74).

Neutrophile Granulozyten besitzen keine Glutathion-Peroxidase-Aktivität. Sie metabolisieren LTA₄ vor allem zu LTB₄ und seinen Abbauprodukten. Ein Teil des synthetisierten LTA₄ lässt sich auch regelmäßig in Form der nicht-enzymatisch entstandenen Zerfallsprodukte, wie den Diastereomeren des 6-trans-LTB₄ und 5,6-di-HETE nachweisen. Granulozyten synthetisieren auch das aus dem initial gebildeten

HPETE abgeleitete 5-HETE (73). Die Aktivierung der 5-Lipoxygenase erfolgt, vergleichbar mit der Phospholipase A₂-Aktivierung, durch eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. Nachfolgend kommt es zur Translokation des Enzyms an die Kernmembran. Hier wird dann nach Interaktion mit dem 5-Lipoxygenase-bindenden-Protein (FLAP), das die Bindung des Enzyms an die Arachidonsäure katalysiert, die Oxygenierung des Substrates eingeleitet (70,75,76).

Von den durch PMN synthetisierten 5-Lipoxygenasemetaboliten entfalten vor allem LTB₄ und in geringerem Ausmaß 5-HETE über auto- und parakrine Mechanismen unzählige proinflammatorische Wirkungen. LTB₄ ist ein sehr stark wirkendes Chemotaxin für Granulozyten, Monozyten und Mastzellen. Weiterhin spielt LTB₄ bei der leukozytär-endothelialen Interaktion als Adhäsions- und Diapedese-induzierender Mediator eine wichtige Rolle (77,78). LTB₄ wird weiterhin eine zentrale autokrine Funktion bei der Steuerung inflammatorischer granulozytärer Reaktionen wie Degranulation und Sauerstoffradikalenbildung zugeschrieben. Es zeigte sich, dass zahlreiche Aktivatoren der Granulozyten, wie das Ca²⁺-Ionophor A 23187 und das bakterielle Tripeptid fMLP ihre pro-sekretorischen Effekte auf Granulozyten indirekt über endogen gebildetes LTB₄ ausüben (79,80). LTB₄ verfügt auch über direkte immunmodulatorische Eigenschaften: *In vitro* stimuliert LTB₄ die Zytokinsynthese in Monozyten und besitzt eine proliferative Wirkung auf T-Lymphozyten (81,82).

Cysteinylleukotriene, die auch als „slow reacting substance of anaphylaxis“ bezeichnet werden, werden vor allem von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten synthetisiert (83). Während die Zielzellen von LTB₄ und 5-HETE primär Leukozyten sind, entfalten LTC₄ und LTD₄ ihre Wirkung hauptsächlich an glatten Muskelzellen. Schon in geringen Konzentrationen haben sie starke bronchospastische und vasokonstriktive Eigenschaften. Bedingt durch eine vorwiegend postkapilläre Vasokonstriktion kommt es zu Plasmaexsudation und Ödembildung (84). Des Weiteren können die Cysteinylleukotriene in einigen Mikrozirkulationsgebieten direkt eine Erhöhung der endothelialen Permeabilität induzieren (84).

1.5. Stickstoffmonoxid (NO)

1980 beobachteten Furchgott und Zawadzki erstmalig, dass ein vom Endothel gebildeter Botenstoff für die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur verantwortlich ist (85). Sie

nannten ihn EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*). 1987 wiesen Palmer et al. und Ignarro et al. nach, dass EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist (86,87).

Stickstoffmonoxid ist der kleinste von Säugetierzellen synthetisierte Botenstoff. Es ist ein instabiles, ungeladenes freies Radikal. Seine geringe Größe, die elektrische Neutralität und die lipophile Natur erlauben eine rasche Diffusion durch die Zellmembranen (10,88).

NO ist ein wichtiger Mediator für die Regulation des Blutflusses, der Endothel- und Thrombozytenfunktion. NO ist ein Neurotransmitter und ein Effektormolekül in der Immunabwehr. Es ist an der Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen, an der Entstehung des Ischämie-Reperfusionsschadens und an der Entwicklung von Gefäßerkrankungen beteiligt (27,88-91). Des Weiteren gilt NO als einer der wichtigsten Mediatoren in der Entwicklung des septischen Schocks und des septischen Multiorganversagens (*systemic inflammatory response syndrome, SIRS*) (92,93).

1.5.1. NO-Synthese

Stickstoffmonoxid wird nicht wie andere Botenstoffe zellulär gespeichert, sondern dem aktuellen Bedarf angepasst synthetisiert. NO entsteht durch Abspaltung und Oxidation eines Stickstoffatoms von L-Arginin durch das Enzym NO-Synthase (NOS). L-Arginin stellt die einzige physiologische Stickstoffquelle zur Bildung von Stickstoffmonoxid beim Menschen dar (92,94). Der L-Arginin-Metabolismus durch die NOS wird über die Höhe der intrazellulären freien Calciumkonzentration reguliert. Zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es rezeptorvermittelt durch Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum bzw. durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Calciumionen binden an das calciumbindende Protein Calmodulin, und nachfolgend der Calmodulin-Calcium-Komplex an die NOS, wodurch die NADPH- und sauerstoffabhängige Umsetzung von L-Arginin initiiert wird (92,94).

Die Mediatorfunktionen von NO werden durch ein spezifisches NO-Rezeptorenzym, die lösliche Guanylat-Zyklase (sGC) vermittelt. Die reversible Bindung von NO an die sGC bewirkt eine Aktivierung des Enzyms, mit nachfolgender Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in den intrazellulären Botenstoff (second-messenger) zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) (10,95-97).

Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit ist NO ein nahezu ausschließlich parakrin und autokrin wirkender Botenstoff, der sehr viele intra- und extrazelluläre Zielmoleküle besitzt.

Tabelle 1: molekulare Wirkmechanismen vom NO (nach 98)

Zielmoleküle	Wirkung	Folge
1. Eisenhaltige Proteine		
<ul style="list-style-type: none"> lösliche Guanylat-Zyklase 	Erhöhung Enzymaktivität	cGMP Produktion erhöht → Vasodilatation, Plättchenaggregationshemmung, Zytotoxizität, Neurotransmission
<ul style="list-style-type: none"> Enzyme der Atmungskette und des Zitratzyklus 	Hemmung des Energiestoffwechsels	Zytotoxizität
<ul style="list-style-type: none"> Cyclooxygenasen 	Erhöhung der Enzymaktivität	Gesteigerte Prostaglandinsynthese
<ul style="list-style-type: none"> Hämoglobin 	Erhöhung von Met-Hb	Inaktivierung von NO durch Oxidation zu Nitrit/Nitrat
<ul style="list-style-type: none"> Hämoglobin 	Bildung von Nitroso-Hb	endogener NO-Donor
<ul style="list-style-type: none"> Ribonukleotid-Reduktase 	Hemmung der Enzymaktivität	Hemmung der DNA-Synthese, Zytotoxizität
<ul style="list-style-type: none"> ADP-Ribosyltransferase 	Erhöhung der Enzymaktivität	Hemmung der Glykolyse
<ul style="list-style-type: none"> Ferritin 	Freisetzung von Eisenionen	Bildung von Sauerstoffradikalen begünstigt
2. Superoxid-Anionen	Bildung von Peroxynitrit	Inaktivierung von Sauerstoffradikalen Entstehung von Hydroxylradikalen Zytotoxizität
3. Nukleinsäuren	Nitrosylierung der Nukleinsäuren	Mutagenität, Zytotoxizität
4. Schwefelhaltige Aminosäuren und Proteine	Bildung von S-Nitroso-Addukten	Endogene NO-Donatoren

1.5.2. NO-Synthasen

Zurzeit unterscheidet man in Säugetierzellen zwei konstitutive NO-Synthasen (cNOS) und eine induzierbare NO-Synthase (iNOS). Benannt wurden die Isoenzyme der cNOS nach den Zellen, in denen sie erstmals nachgewiesen wurden (98,99).

Alle NO-Synthasen benötigen Flavinmononucleotid (FMN), Flavin-Adeninnucleotid (FAD), Calmodulin, Häm und Tetrahydropterin als Co-Faktoren. Als Co-Substrate fungieren L-Arginin, Sauerstoff und NADPH (98,99).

1.5.2.1. konstitutive NO-Synthase – cNOS (NOS I, III)

NOS I Nervenzellen (ncNOS)

NOS III Endothelzellen (ecNOS)

Die ncNOS befindet sich nahezu ausschließlich im Nervengewebe sowie in Skelettmuskelzellen (99-101). Die ecNOS ist dagegen bislang in vielen Zellarten, u.a. in Endothelzellen und Kardiomyozyten nachgewiesen worden (99-101).

Die cNOS-Isoenzyme sind stets in den Zellen nachweisbar. Die Enzymaktivität wird durch den intrazellulären Calciumspiegel reguliert. Binden Acetylcholin, Bradykinin oder anderen Botenstoffe an entsprechende Rezeptoren, führt dies zum intrazellulären Calciumanstieg mit nachfolgender Aktivierung des Calcium-Calmodulin-Signaltransduktionsweges (99-101). Die Menge des gebildeten NO wird durch die Modulierung der Enzymaktivität mittels intrazellulärer Calciumkonzentration gesteuert (101). Experimentell kann der intrazelluläre Calciumanstieg durch das Ca^{2+} -Ionophor A 23187 induziert werden.

1.5.2.2. induzierbare NO-Synthase - iNOS (NOS II)

Dieses NO-Synthase-Isoenzym wird nur bei Bedarf exprimiert. Die genetische Information zur Synthese der iNOS findet sich in praktisch allen Körperzellen. Die Expression des Gens und die anschließende *de novo*-Synthese des iNOS-Proteins wird durch LPS und durch proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{INF}\gamma$ über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{-B}$ induziert (10,98). Dieser Vorgang findet vor allem in den Zellen des Monozyten-Makrophagensystem, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen aber auch in Hepatozyten statt (99,101).

Während die von den cNOS-Isoenzymen synthetisierte NO-Menge lediglich im nanomolaren Bereich liegt, werden durch die iNOS NO-Syntheseraten erzielt, die im mikromolaren Bereich liegen (98). Hauptursache für diese unterschiedlichen Synthesemengen ist die Calciumunabhängigkeit der iNOS. Das zur Enzymaktivierung notwendige Calmodulin ist bei der iNOS fest mit dem Enzymmolekül verbunden, sodass eine intrazelluläre Calciumerhöhung zur Enzymaktivierung nicht notwendig ist. Die Menge des von der iNOS gebildeten NO wird nur durch das Vorhandensein der zur Synthese notwendigen Substrate und Co-Faktoren bestimmt (99,102-104).

1.5.3. NO-Metabolismus

NO wird in Gegenwart von Sauerstoff oder Hämoglobin sehr schnell zu den stabilen Metaboliten Nitrat und Nitrit oxidiert, die renal eliminiert werden (116). Des Weiteren kann NO auch mit schwefelhaltigen Aminosäuren und Proteinen, im Blut mit Albumin, zu S-Nitrosoverbindungen reagieren, aus denen NO auch wieder freigesetzt werden kann. Die physiologische Bedeutung dieser S-Nitrosoverbindungen als endogene NO-Donatoren ist derzeit noch nicht vollständig geklärt (105,106).

Es ist schon länger bekannt, dass NO mit reaktiven Sauerstoffspezies zu einer Vielzahl von Verbindungen reagieren kann, die zum Teil reaktiver und toxischer sind, als die Ausgangssubstanz Stickstoffmonoxid (107). Im Rahmen von Entzündungen, Ischämie-Reperfusionen-Ereignissen und einer Endotoxinämie werden NO und Superoxid-Anionen (O_2^-) gleichzeitig gebildet. O_2^- kann zum einen durch die partielle Entkopplung der Atmungskette (Ischämie) sowie durch die NADPH-Oxidase aktivierter neutrophiler Granulozyten synthetisiert werden (107). Das aus der Reaktion von NO und O_2^- hervorgehende Peroxynitrit ($ONOO^-$) ist extrem zytotoxisch. Erwünscht ist diese Peroxynitrit-Bildung im Rahmen der unspezifischen (angeborenen) Immunabwehr (107,108). Einen autoaggressiven Charakter bekommt dieser Mechanismus im Rahmen von chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen.

1.5.4. NO und Inflammation

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion wird die induzierbare NO-Synthese von Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und anderen involvierten Zellen unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine und LPS exprimiert (10,98-100). Nachfolgend kommt es zur Synthese und Freisetzung großer Mengen NO, die die

physiologische NO-Freisetzung durch die konstitutiven Enzyme um das 100-1000 fache übersteigt (98-100,109).

Durch die proinflammatorischen Effekte von NO wird in einer Vielzahl von Zellen u.a. die Freisetzung von TNF α und IL-8 stimuliert und die Cyclooxygenase aktiviert (42,110,111). Das freigesetzte NO wirkt weiterhin über seine molekularen Angriffspunkte bzw. vermittelt durch das Sekundärprodukt Peroxynitrit toxisch auf Bakterien, Pilze, Tumorzellen (Tabelle 1,107,108,112,113). Die durch die hohen NO-Konzentrationen mitbedingte Schädigung gesunden Gewebes wird im Rahmen inflammatorischer Situationen in Kauf genommen (98-100).

Umgekehrt spielt das in geringen Mengen von den konstitutiven NO-Synthasen gebildete NO eine antiinflammatorische Rolle. Es supprimiert die T-Zell-Aktivität und T-Zell-Proliferation, inhibiert die Synthese von IL-6, Prostaglandin E₂ und Thromboxan A₂ in Makrophagen sowie die Freisetzung von Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF) und Histamin aus Mastzellen. Weiterhin bewirkt es eine Hemmung der Granulozytenadhäsion und Granulozytenmigration und hemmt die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in PMN durch Inaktivierung der granulozytären NADPH-Oxidase (90,98,114,115). Als weiterer protektiver Faktor ist die Aufrechterhaltung und Steuerung der Gewebepfusion aufgrund seiner vasodilatativen und aggregationshemmenden Eigenschaften zu nennen (116).

1.5.5. NO und chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Bei CED ist NO als proinflammatorischer Mediator an der Pathogenese zentral mitbeteiligt (117). In verschiedenen Tier- und Zellmodellen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen konnte eine erhöhte NO-Produktion in der Mukosa durch die induzierbare NO-Synthase nachgewiesen werden (98,117,118).

Über die molekularen zytotoxischen Wirkmechanismen von NO, durch entstehendes Peroxynitrit und durch die Hemmung von Enzymen der Atmungskette in den Mitochondrien der Enterozyten, kommt es zur Zerstörung der Kontinuität des Darmepithels mit weiterer Perpetuierung des Entzündungsprozesses und der Möglichkeit der bakteriellen Durchwanderung (119-121).

1.6. Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (PMN) sind mit die erste Verteidigungsinstanz des menschlichen Körpers nach dem Eindringen von Fremdorganismen und Fremdkörpern. Auch im späteren Verlauf eines inflammatorischen Prozesses sind sie die zahlenmäßig stärkste Zellpopulation im Entzündungsgebiet. Bildungsort der PMN ist das Knochenmark, in dem die Granulozytopoese 66 - 75 % aller kernhaltigen Zellen ausmacht. Ausgangspunkt ist die unipotente Stammzelle der granulozytären Zellreihe, die aus der pluripotenten hämopoetischen Stammzelle hervorgeht. Während des Reifungsprozesses kommt es zur Bildung des typischen segmentierten Zellkernes und der namensgebenden intrazytoplasmatischen Granula (122,123). Steuernd auf die Proliferation und Differenzierung wirken zum einen Wachstumsfaktoren wie G-CSF und GM-CSF, zum anderen verschiedene Interleukine wie IL-1, IL-3, IL-6 sowie auch der periphere Verbrauch der PMN (122).

Neutrophile Granulozyten sind die einzigen Zellen der Immunabwehr, von denen es im Knochenmark und auch im Kapillarbett der Lunge größere Reserven gibt, die bei Bedarf innerhalb weniger Stunden freigesetzt werden können (122).

Die Fähigkeit zur Chemotaxis und zur Migration ermöglicht es den Granulozyten gerichtet aus der Blutbahn in das „Zielgebiet“ einzuwandern. Dies erfolgt entlang eines ansteigenden Konzentrationsgradienten chemotaktisch wirkender Botenstoffe, wie beispielsweise IL-8 (124). Dort kommt es dann zur Phagozytose der Pathogene mit nachfolgender Verschmelzung des Phagosoms mit den intrazellulären Granula. Während dieses Vorgangs werden die in inaktiver Form in den Granula gespeicherten Enzyme aktiviert. Dabei wirken sauerstoffunabhängige und sauerstoffabhängige Mechanismen synergistisch (125).

Durch diese intrazellulär ablaufenden vesikelgebundenen Mechanismen wird die Schädigung des umgebenden Gewebes auf ein Minimum reduziert. Fusionieren dagegen die Granula mit der Zellmembran, resultiert eine Enzymfreisetzung ins Gewebe mit anschließender Degradation von Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix. Dies kommt im Rahmen der Chemotaxis sowie auch häufig bei überschießenden inflammatorischen Reaktionen vor (126).

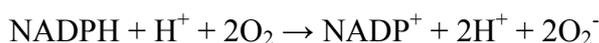
Neben der Abwehr bakterieller Infektionen spielen die neutrophilen Granulozyten eine Schlüsselrolle in der Pathogenese vieler akuter und chronischer Erkrankungen, autoimmunologischer Erkrankungen sowie im Rahmen der Arterioskleroseentstehung und in der Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens (127-129).

1.6.1. Bildung von Sauerstoffradikalen – *respiratory burst*

Im Jahr 1933 machten Baldrige und Gerard die Beobachtung, dass der granulozytäre Sauerstoffverbrauch während des Phagozytosevorgangs bis auf das 100 fache ansteigt (130,131). Bei diesem als *respiratory burst* bezeichneten Phänomen handelt es sich um die sequenzielle Synthese reaktiver Sauerstoffspezies aus molekularem Sauerstoff mithilfe des Enzyms NADPH-Oxidase. Aus dieser Beziehung lässt sich ableiten, dass die mikrobizide Fähigkeit der Granulozyten, jedoch nicht die Fähigkeit zur Phagozytose unter anaeroben Gegebenheiten stark vermindert ist (131,132).

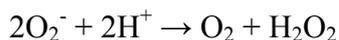
Die NADPH-Oxidase ist ein Multienzymkomplex, der aus einer Cytochrom-b-abhängigen membranständigen Komponente (rap1a, p22phox, gp91phox), die als Elektronenakzeptor wirkt, und aus mehreren zytosolischen Proteinen (p21rac, p67phox, p47phox) zusammengesetzt ist (132,133). In ruhenden Granulozyten liegen die einzelnen Komponenten dissoziiert vor. Nach Stimulation der PMN kommt es unter Mitwirkung des Zytoskeletts sowie durch eine Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung zur Translokation der zytosolischen Proteine an die membranständige Komponente. In der Folge tritt eine Konformationsänderung der membranständigen Untereinheit mit Freilegung der enzymatisch wirksamen Abschnitte auf.

Die Aktivierung des Enzyms erfolgt über einen intrazellulären Calciumeinstrom. Dieser kann experimentell durch das Ca^{2+} -Ionophor A 23187 oder durch fMLP erzeugt werden (134,135). Die NADPH-Oxidase katalysiert primär die Bildung von Superoxid-Anionen (O_2^-) durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff:

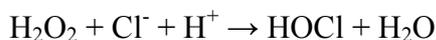


NADPH ist bei dieser Reaktion der Elektronendonator (126,134). Die Regeneration von NADP^+ zu NADPH erfolgt im Pentosephosphat-Weg.

Das Superoxid-Anion hat nur eine geringe mikrobizide Wirkung. In nachfolgenden Reaktionen erfolgt seine Umwandlung in sehr viel reaktivere Sauerstoffspezies (135). Als Erstes erfolgt die spontane Dismutation zu Hydrogenperoxid (H_2O_2):



H_2O_2 bildet die Grundlage für die Synthese weiterer reaktiver Verbindungen. Die in den primären Granula gespeicherte Myeloperoxidase katalysiert die Synthese von Hypochlorsäure aus H_2O_2 und Chloridionen:



Bei Anwesenheit des eisenhaltigen Enzyms Lactoferrin, einem Enzym der sekundären Granula, wird aus H_2O_2 das extrem toxische Hydroxylradikal (OH^*) gebildet.

Die reaktiven Sauerstoffverbindungen entfalten ihre destruktive Wirkung über verschiedene Mechanismen. Zum einen können sie direkt mit Proteinen, Nucleinsäuren oder Membranbestandteilen reagieren, zum anderen inaktivieren sie körpereigene Proteaseinhibitoren und gewährleisten so die maximale Wirkung granulozytärer Proteasen (136,137).

1.6.2. Granulozytäre Enzyme

Neutrophile Granulozyten besitzen ein umfangreiches Arsenal antimikrobieller und proteolytischer Enzyme. Diese Enzyme befinden sich intrazytoplasmatisch in abgeschlossenen Kompartimenten, den Granula (122,123).

Die Granula unterscheiden sich in ihrem zeitlichen Auftreten während der Entwicklung der PMN im Knochenmark, in ihrem Feinbau, ihrem Enzymmuster und in ihrem Färbeverhalten. Man differenziert heute primäre, sekundäre und tertiäre Granula (122,123).

1.6.2.1. Primäre Granula

Sie sind bereits in den frühesten Entwicklungsstadien nachweisbar. Die Hauptinhaltsstoffe sind die Myeloperoxidase, saure Hydrolasen (saure Phosphatase, α -Mannosidase) und neutrale Proteasen (Elastase, Cathepsin G) (138,139). Diese Enzyme befinden sich auch in den Lysosomen anderer Zelltypen. Neben ihrer mikrobiziden Wirkung werden die Enzyme der primären Granula mit der Pathogenese von Gewebeschäden in Verbindung gebracht (140,141).

1.6.2.2. Sekundäre Granula

Sie werden in fortgeschrittenen Stadien der Granulozytopoese gebildet. Die Inhaltsstoffe werden hauptsächlich in den Extrazellularraum abgegeben. Neben dem antimikrobiell wirkenden Lysozym ist es die Kollagenase, die als gewebedegradierendes Enzym die Chemotaxis der PMN fördern soll (142). Verschiedene in diesen Granula gespeicherte Proteine wie Vitamin B₁₂-bindendes Protein oder Lactoferrin entziehen den Mikroorganismen essenzielle Nährstoffe (143). Des Weiteren enthalten diese Granula verschiedene Rezeptoren (fMLP-Rezeptor, Adhäsine, Fibrinogen-Rezeptor), die nach Aktivierung der PMN auf der Zelloberfläche exprimiert werden und so zur Interaktion mit den entsprechenden Agonisten zur Verfügung stehen (144).

1.6.2.3. Tertiäre Granula

Hauptinhaltsstoff dieser am Ende des granulozytären Reifungsprozesses gebildeten Granula ist die Gelatinase, ein mit der Kollagenase vergleichbares Matrix-degradierendes Enzym (145). Bislang ist es ungeklärt, ob die tertiären Granula eine eigenständige Population darstellen, oder ob sie nur Subtypen der primären Granula sind.

Als Beispiel für die Freisetzung granulozytärer Enzyme im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses wurde im Rahmen der durchgeführten Experimente die freigesetzte Menge der neutrophilen Elastase bestimmt. Die Elastase ist eine stark kationische Serinprotease mit einem Wirkungsoptimum im neutralen pH-Bereich und einem Molekulargewicht von 25 - 30 kD. Elastin, Laminin, Kollagen, Proteoglykane und Fibronectin sind ihre natürlichen Substrate (146,147). Sie ist als Komplex mit negativ geladenen Glykosaminoglykanen in inaktiver Form in den primären Granula gespeichert. Extrazellulär freigesetzt dient die granulozytäre Elastase neben der Zerstörung von nicht phagozytierbarem Fremdmaterial der Fortbewegung der PMN, indem die extrazelluläre Matrix destruiert wird. Unter physiologischen Bedingungen beschränken sich die Gewebe-destruierenden Prozesse auf die unmittelbare Umgebung der Granulozyten, da Proteaseinhibitoren im menschlichen Organismus ubiquitär vorhanden sind (148). Lokale Veränderungen im Rahmen inflammatorischer Prozesse können ein Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Proteaseinhibitoren mit nachfolgender Gewebeschädigung bedingen.

1.7. CaCo-2B-Zellen als Modell

CaCo-2B-Zellen sind eine polytetraploide Zelllinie, die von Kolonkarzinom-Zellen abstammt. Sie wurden 1977 von J. Fogh als stabile Zelllinie für experimentelle Untersuchungen etabliert (149). Trotz ihrer Abstammung von Tumorzellen ist die Kontaktinhibition erhalten geblieben. In der Zellkultur bilden die Zellen Monolayer und beginnen im Stadium der Konfluenz IEC (intestinal epithelial cells)-artig auszudifferenzieren. Obwohl es Zellen sind, die von Kolonepithelzellen abstammen, entwickeln sie hierbei eine Morphologie und Enzymausstattung, die mit Dünndarmepithelzellen vergleichbar ist (150).

Die Zellen zeigen dann das typische polare Wachstum mit der Ausbildung eines Bürstensaumes und eines Schlussleistennetzes. CaCo-2B-Zellen sind in der Lage, „brush

border“ Enzyme wie die Alkalische Phosphatase, die Dipeptidyl-Peptidase, die Laktase sowie die Sucrase-Isomaltase zu synthetisieren (151-153). Diese Eigenschaften prädestinieren diese Zellen für Untersuchungen über transepitheliale Transportmechanismen und den „drug uptake“ (154,155). Des Weiteren sind aus der Literatur zahlreiche Untersuchungen über die von CaCo-2B-Zellen gebildeten Entzündungsmediatoren, Adhäsionsmoleküle und Oberflächenrezeptoren bekannt. Diese zeigen, dass CaCo-2B-Zellen in der Lage sind, ein breites Spektrum an Entzündungsmediatoren wie beispielsweise LTB₄, IL-8, IL-6 und TNF α zu synthetisieren. Aber auch antiinflammatorische Mediatoren wie TGF- β können von CaCo-2B-Zellen gebildet werden (152,156,157). Jedoch ist die Datenlage zu diesem komplexen Sachverhalt nicht einheitlich.

Das von CaCo-2B-Zellen synthetisierte Mediatorenspektrum ist mit dem normaler IEC vergleichbar. Auch die präsentierten Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren entsprechen denen humaner IEC. So verfügen sie über Enzyme wie der Superoxid-Dismutase (SOD) oder dem sekretorischen Leukozyten-Protease-Inhibitor (SLPI). Dadurch sind sie in der Lage, sich vor Zellschäden durch die neutrophile Elastase und durch zytotoxische Sauerstoffmetaboliten zu schützen (158,159). Aktuell liegen Daten vor, die die Möglichkeit einer Beeinflussung inflammatorischer Reaktionen durch IEC bzw. CaCo-2B-Zellen untersuchen. Dagegen gibt es nur sehr wenige Untersuchungen über die Interaktion zwischen PMN und IEC bzw. CaCo-2B-Zellen.

1.8. Fragestellung

Im Rahmen einer vorangegangenen Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass CaCo-2B-Zellen in der Lage sind, die granulozytäre Elastasefreisetzung und die granulozytäre Synthese reaktiver Sauerstoffspezies signifikant zu unterdrücken, wenn die Stimulation der Zellen mit den Ca²⁺-Ionophor A 23187 erfolgt. Wurden dagegen in Gegenwart von CaCo-2B-Zellen lediglich die neutrophilen Granulozyten aktiviert, wie beispielsweise mittels des bakteriellen Tripeptides fMLP, erfolgte keine Abschwächung der destruktiven granulozytären Zellreaktionen (160). Dieser modulierende Effekt der CaCo-2B-Zellen auf die granulozytäre Elastase- und Superoxidfreisetzung konnte durch die Zugabe eines Cyclooxygenase- oder eines Lipoxigenasinhinhibitors nicht aufgehoben werden. Wurden die CaCo-2B-Zellen dagegen mit einem PAF-Rezeptorantagonisten oder mit einem Inhibitor der NO-Synthase vorinkubiert, zeigte sich eine Aufhebung des supprimierenden Einflusses

auf die granulozytäre Elastasefreisetzung. Der supprimierende Effekt auf die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies blieb dagegen erhalten (160).

Vor diesem Hintergrund war es Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen, ob eine Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen oder mit Endotoxin (LPS) die Interaktion zwischen CaCo-2B-Zellen und neutrophilen Granulozyten verändert.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Lässt sich die Suppression der destruktiven granulozytären Reaktionen durch Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen oder LPS aufheben?
2. Moduliert die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen oder Endotoxin die Synthese der Chemokine IL-8 und MCP-1 bzw. von NO in diesen Zellen?
3. Wird die granulozytäre Synthese von Leukotrienen durch Co-Inkubation mit CaCo-2B-Zellen moduliert?
4. Beeinflusst die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen oder LPS die granulozytäre Leukotriensynthese bei Co-Inkubation mit diesen CaCo-2B-Zellen?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Experimentelle Agenzien

2.1.1.1. Einzelsubstanzen

A 23187 (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland)

2-Amino-2(hydroxymethyl)1,3-popanediol (TRIS) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Aqua dest. (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Cytochrom-C (Sigma, Steinheim, Deutschland)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Endotoxin (LPS) aus E.coli Stamm (Sigma, Steinheim, Deutschland)

Essigsäure 98 % (CH₃COOH) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-valine-p-nitroaniline (Chromogenes Substrat für Elastasemessung) (Chromogenix Instrumentation Laboratory, Mailand, Italien)

Natriumchlorid (NaCl) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

1 n Natriumhydroxid (NaOH) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) (Sigma, Steinheim, Deutschland)

Polyoxyethylenesorbitan Monooleate (Tween 80) (Sigma, Steinheim, Deutschland)

Rekombinantes humanes Interferon- γ (IFN γ) (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Rekombinantes humanes Interleukin-1 β (IL-1 β) (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Rekombinanter humaner Tumornekrosefaktor- α (TNF α) (R&D Systems, Minneapolis, USA)

1 M Salzsäure (HCl) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Superoxid-Dismutase (SOD) (Sigma, Steinheim, Deutschland)

2.1.1.2. Lösungen/Puffer

- Messpuffer für Elastasemessung

60 ml Aqua dest.

+ 1,21 g TRIS

+ 5,62 g NaCl

mit 1 M HCL auf pH 8,3 einstellen und mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

- Verdünnungspuffer für Elastasemessung

60 ml Aqua dest.

+ 1,2 ml Essigsäure 98 %

+ 0,1 g Tween 80

mit 1 n NaOH auf pH 5,5 einstellen und mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

- Substrat für Elastasemessung

25 mg Chromogenes Substrat

+ 7 ml DMSO

für Messung 1:4 mit Aqua dest. verdünnen

2.1.2. Medien und Agenzien für PMN-Isolation und Zellkultur

2.1.2.1. Einzelsubstanzen

Aqua dest. (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Bovines Serum Albumin (BSA) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Dulbecco's PBS w/o Ca und Mg 10 x (PAA Laboratories, Linz, Österreich)

Dulbecco's MEM + 25 mM Hepes + 4500 mg Glucose, ohne Pyruvat und Glutamin
(Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Fetales Kälberserum (FCS) (PAA Laboratories, Linz, Österreich)

Ficoll-Paque Research Grade (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

Glucose 10 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Glutamin 100 x (PAA Laboratories, Linz, Österreich)

Hanks' balanced salt solution cum Ca^{2+} + Mg^{2+} (HBSS) (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Humane Kolonadenokarzinom-Zelllinie 2B (CaCo-2B-Zellen) (WAK-Chemie, Bad
Homburg, Deutschland)

Kaliumchlorid (KCl) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

MEM nicht-essenzielle Aminosäuren 100 x (Gibco, Grand Island, USA)

N-2-hydrylethylpiperazine-N'-2-ethansulfonic acid (HEPES) (Roth, Karlsruhe,
Deutschland)

Natriumchlorid (NaCl) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Natriumchlorid-Lösung 0,9 % (NaCl 0,9 %) steril (Braun, Melsungen, Deutschland)

1 n Natriumhydroxid (NaOH) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Penicillin/Streptomycin 100 x (PAA Laboratories, Linz, Österreich)

Phosphate-buffered-saline^{-/-} 10 x (PBS^{-/-} 10 x) (PAA Laboratories, Linz, Österreich)

Polyvinylalkohol (PVA) (Merck, München, Deutschland)

Sodium Pyruvate Solution 100 mM (PAA Laboratories, Linz, Österreich)

Trypan Blau 0,5 % (Boehringer, Mannheim, Deutschland)

Trypsin 10 x (Gibco BRL, Paisley, Schottland)

2.1.2.2. Lösungen

- Hepes 0,2 mM

1 l Aqua dest.

+ 47,6 g HEPES

mit 1 n NaOH auf pH 7,4 einstellen

- Hepes Buffered Saline (10 x)

1 l Aqua dest.

+ 80 g NaCl

+ 10 g Glucose

+ 4 g KCl

+ 0,6 g KH₂PO₄

+ 0,9 g Na₂HPO₄

- Hanks/Hepes cum Ca²⁺ + Mg²⁺ (H/H^{+/+})

900 ml Aqua dest.

+ 6 g HEPES

+ 100 ml HBSS

mit 1 n NaOH auf pH 7,4 einstellen

- Kulturmedium für CaCo-2B-Zellen

10 % FCS

1 % Penicillin/Streptomycin
 1 % MEM nicht-essenzielle Aminosäuren
 auf 100 ml Dulbecco`s MEM

- Polyvinylalkohol (PVA)

1 l NaCl 0,9 %
 + 10 g Polyvinylalkohol

- Trypsin-Gebrauchslösung (pH 7,4)

80 ml NaCl 0,9 %
 + 10 ml Trypsin 10 x
 + 10 ml 0,2 mM Hepes

2.1.2.3. Zellkulturmaterial

2 ml Eppendorf-Cups, 6-Well-Platten, 12-Well-Platten, T-25-Zellkulturflaschen, T-75-Zellkulturflaschen, konische Röhrchen 50 ml, sterile Pipetten für Zellkultur 25 ml und 50 ml, Sterilfilter, Aspirationspipetten
 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Falcon Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland; Costar, Cambridge, USA; Nunc, Naperville, USA; Millipore-Corporation, Billerica, USA)

2.1.3. ELISA-Materialien

2.1.3.1. Substanzen für Puffer/Diluent

Aqua dest. (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 2-Amino-2(hydroxymethyl)1,3-popanediol (TRIS) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 Bovines Serum Albumin (BSA) (PAA Laboratories, Linz, Österreich)
 Natriumazetat-Trihydrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot x \text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 Natriumazid (NaN_3) (Sigma, Steinheim, Deutschland)
 Natriumchlorid (NaCl) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 Phosphate-buffered-saline^{-/-} 10 x ($\text{PBS}^{-/-}$ 10 x) (PAA Laboratories, Linz, Österreich)
 Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Saccharose reinst (Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.1.3.2. Puffer

- Blockpuffer (pH 7,3)

100 ml PBS^{-/-} 1 x

+ 1 g BSA

+ 5 g Saccharose

+ 0,05 g NaN₃

- Diluentpuffer (pH 7,3)

200 ml Aqua dest.

+ 0,2 g BSA

+ 1,75 g NaCl

+ 0,48 g TRIS

+ 0,1 ml Tween 20

- Substratpuffer (pH 4,2)

1 l Aqua dest.

+ 8,2 g CH₃COONa·x 3 H₂O

+ 6,9 g NaH₂PO₄ x H₂O

- Waschpuffer (pH 7,3)

1 l Aqua dest.

+ 2,4 g TRIS

+ 0,5 ml Tween 20

2.1.3.3. Standards und Antikörper

Rekombinates humanes IL-8 (IL-8) (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Monoklonaler Anti-human IL-8-Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Biotinylierter Anti-human IL-8-Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Rekombinantes humanes MCP-1 (MCP-1) (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Monoklonaler Anti-human MCP-1-Antikörper (R&D Systems, Minneapolis USA)

Biotinylierter Anti-human MCP-1-Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, USA)

2.1.3.4. Assay-Substanzen

Meerrettichperoxidase-Streptavidin (HRP-Streptavidin) (Zymed, San Francisco, USA)

Diammonium-2,2'-azinobis-(3ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) (Boehringer, Mannheim, Deutschland)

Hydrogenperoxid (H₂O₂) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

2.1.3.5. Materialien

96-Well ELISA-Platte (Falcon Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Human eNOS Immunoassay (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

2.1.4. Agenzien und Materialien für die NO-Messung

2.1.4.1. Einzelsubstanzen

Aktivkohle (Fluka, Bern, Schweiz)

Aqua dest. (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Natriumhydroxid (NaOH) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Natriumnitrat (NaNO₃) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Natriumnitrit (NaNO₂) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Salzsäure 37 % (HCl) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Sauerstoff (O₂) 4.5 (Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland)

Stickstoff (N₂) 5.0 (Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland)

Stickstoffmonoxid (NO) 109 ppb und 800 ppm (Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland)

Vanadium(III)-Chlorid (VCl₃) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Zinksulfat (ZnSO₄) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.1.4.2. Lösungen

- 0,1 M VCl₃ 2 M HCl-Reduktionslösung

400 ml Aqua dest.

+ 7 g VCl₃

+ 100 ml 37 %ige HCL

- 30 %ige ZnSO₄-Lösung

30 ml Aqua dest.

+ 9 mg ZnSO₄

- 0,5 M NaOH-Lösung

32,5 ml Aqua dest.

+ 650 mg NaOH

2.1.4.3. Materialien

Glasgefäß beheizbar (150 ml) mit Glasfritte (Porengröße 3) (Kalensee, Gießen, Deutschland)

Glaskolben zweihalsig (Kalensee, Gießen, Deutschland)

Jacket-Intensivkühler (Kalensee, Gießen, Deutschland)

Kühlfalle (100 ml) (Kalensee, Gießen, Deutschland)

Pumpenschläuche Tygon (Innendurchmesser 0,95 und 2,06 mm) (Kalensee, Gießen, Deutschland)

2.1.5. HPLC-Materialien

2.1.5.1. authentische Standards

Leukotrien B₄ (LTB₄) (Paesel, Frankfurt/Main, Deutschland)

ω-Carboxy-Leukotrien B₄ (ω-COOH-LTB₄) (Paesel, Frankfurt/Main, Deutschland)

ω-Hydroxy-Leukotrien B₄ (ω-OH-LTB₄) (Paesel, Frankfurt/Main, Deutschland)

6-trans-Leukotrien B₄ (6-trans-LTB₄) (Merck-Frost, Toronto, Kanada)

6-trans-epi-Leukotrien B₄ (6-trans-epi-LTB₄) (Merck-Frost, Toronto, Kanada)

5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) (Paesel, Frankfurt/Main, Deutschland)

5,6-Dihydroxyeicosatetraensäure (5,6-DiHETE) (Merck-Frost, Toronto, Kanada)

5,6-epi-Dihydroxyeicosatetraensäure (5,6-epi-DiHETE) (Merck-Frost, Toronto, Kanada)

2.1.5.2. Lösungsmittel

Ammoniak'sche Lösung 0,25 % (NH₄OH) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Chloroform reinst (HCCl₃) (Fluka, Bern, Schweiz)

Essigsäure (CH₃COOH) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Isopropanol (C₃H₈O) (Fluka, Bern, Schweiz)

Methanol reinst (CH₃OH) (Fluka, Bern, Schweiz)

2.1.5.3. Säulenmaterial und Vorsäulen

Leersäulen 25 cm, Edelstahl (Shandon, Runcorn, England)

Packungsmaterial Octadecylsilyl-Hypersil, Partikelgröße 5 µm (Machery Nagel, Düren, Deutschland)

C-18-Silica-Gel-Säulen, 1 cm³ Volumen (Bond-Elut, Leverkusen, Deutschland)

2.1.6. Geräte

Zellshaker Vibrax VXR (IKA-Labortechnik, Stauff, Deutschland)

Chemilumineszenzdetektor UPK 3100 (UPM, Langgöns, Deutschland)

CO₂-Inkubator IR 1500 (Flow Laboratories, Meckenheim, Deutschland)

Dialux Mikroskop (Olympus, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland)

Eppendorf Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, USA)

Fluorimeter Fluoroskan (Ascent Labsystems, Frankfurt/Main, Deutschland)

Hamilton-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz)

HLPC-System Gynkotek Model GINA 160 (Gynkotek, München, Deutschland)

Heidolph Vortex-Schüttler REAX 2000 (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland)

Infusionsrollerpumpe ISMATEC IP 12 SA 8031 (Isamtec, Zürich, Schweiz)

Injektomat (Isamtec, Zürich, Schweiz)

Laminar Air Flow Hera Safe (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Membran-Vakuumpumpe S/N 103473 (UPM, Langgöns, Deutschland)

Millipore Q Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Eschborn, Deutschland)

Mikrometer-Ventil (Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland)

Phasen-Kontrast Mikroskop (Olympus, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland)

Thermomix[®] BU (Braun, Melsungen, Deutschland)

Umwälzpumpe Little-Giant[™] (Little Giant Pump Co., Oklahoma City, USA)

Varifuge 3.OR (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Zentrifuge AP Rotanta (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

2.2. Methodik

2.2.1. Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

Humane neutrophile Granulozyten (PMN) wurden aus peripherem Blut durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten gewonnen. Diese Methode wurde erstmals von Bøyum beschrieben (161). Die Isolation erfolgte standardmäßig unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C). Die Isolationsdauer betrug je nach verwendeter Vollblutmenge 1,5 bis 2 Std.

Blutentnahme

Das Durchschnittsalter der gesunden Spender lag bei 25 Jahren. Durch Punktion einer peripheren Vene in der Armbeuge mit einer Kanüle der Größe 19 G erfolgte die Blutentnahme. Das Blut wurde in eine mit dem Antikoagulans EDTA vorgefüllte Spritze geleitet. Die Endkonzentration des EDTA betrug 0,125 %.

Ficoll-Gradient

In 50 ml-fassende sterile Röhrchen wurden jeweils 15 ml Ficoll vorgelegt. Das gewonnene Blut wurde zunächst 1:2 mit PBS^{-/-} 1 x verdünnt. 35 ml dieses Gemisches wurden anschließend mit einer sterilen 50 ml Pipette auf die vorgelegte Ficoll-Lösung aufgeschichtet.

Das so vorbereitete Blut wurde für 35 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Während der Zentrifugation kam es durch die Wechselwirkung zwischen den zellulären Blutbestandteilen und dem Ficoll zu einer Auftrennung der einzelnen Zellpopulationen. Granulozyten und Erythrozyten sedimentierten durch das Ficoll hindurch. An der Grenze zwischen Ficoll und dem thrombozytenreichen Plasma lagerten sich die mononukleären Zellen ab. Plasma, mononukleäre Zellen und Ficoll wurden abgesaugt. Die Abtrennung der Erythrozyten von den PMN erfolgte durch Sedimentation der Erythrozyten nach Mischen mit einer 10 %igen Polyvinylalkohol (PVA)-Lösung im Verhältnis 1:3. Der Sedimentationsschritt dauerte ca. 10 Minuten. Der PMN-reiche Überstand wurde mittels einer Pipette in neue Röhrchen überführt und bei 150 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden durch hypotone Lyse noch verbliebene Erythrozyten entfernt. Dazu wurden die Zellen in 18 ml Aqua dest. resuspendiert; nach 30 Sekunden erfolgte der Stopp der Lyse durch Hinzugabe von 2 ml PBS^{-/-} 10 x. Die vollständige Reinigung der PMN von

Ficoll-Rückständen erfolgte durch zwei nachfolgende Waschschrirte mit PBS^{-/-} 1 x (150 x g; 10 Minuten).

Zellzählung, Identifizierung

Die Quantifizierung der Zellen wurde durch lichtmikroskopische Zählung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bei 400-facher Vergrößerung zwischen den beiden letzten Waschschrirten durchgeführt. Durchschnittlich ließen sich aus 50 ml Vollblut ca. 100 Millionen PMN isolieren.

In regelmäßigen Abständen wurde die Reinheit der isolierten humanen PMN mittels maschinellm Differenzialblutbild kontrolliert. Der Anteil der Granulozyten lag bei 97 %. Mit jeweils 1 % waren Mono- und Lymphozyten vertreten. Die restlichen Zellen waren Eosinophile und Basophile.

Die Zellvitalität wurde mittels Trypan-Blau-Ausschlussmethode und der LDH-Freisetzung überprüft. Am Ende der Isolation waren 98 % der PMN nachweislich vital. Die spontane LDH-Freisetzung der PMN in Bezug auf die absolute Enzymfreisetzung durch Mellitin lag stets unter 3 %.

2.2.2. Erfassung granulozytärer Funktionsparameter

2.2.2.1. Degranulierung

Prinzip

Die PMN speichern in ihren Granula eine Vielzahl enzymatisch aktiver Substanzen. Der Nachweis von granulozytären Inhaltsstoffen im Zellüberstand gilt als Indikator einer abgelaufenen Degranulationsreaktion. Durch die Quantifizierung des proteolytischen Enzyms Elastase wurde das Ausmaß der Degranulationsreaktion bestimmt. Über die Bildung eines fotometrisch detektierbaren Reaktionsproduktes wurde die Enzymaktivität nach der Methode von Kramps kinetisch erfasst (162).

Durchführung

Substrat für das Enzym Elastase ist L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-valine-p-nitroaniline. Die Geschwindigkeit des Substratumsatzes und die damit verbundene fotometrisch bestimmbare Extinktionszunahme bei 405 nm wurde als Marker für die Elastase-Aktivität gewertet. Zur Durchführung dieses Assays wurden zunächst 200 µl Messpuffer und 100 µl Verdünnungspuffer in eine Küvette vorgelegt. Nach Zugabe von 100 µl Zellüberstand

wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 200 µl Substrat gestartet. Die Extinktionszunahme wurde in einem Fotometer bei 405 nm kontinuierlich über einen Zeitraum von 3 Minuten gemessen. Standardmäßig erfolgte die Messung bei 37 °C.

Die errechnete Enzymaktivität wurde in Beziehung zum zellulären Gesamtgehalt des Enzyms gesetzt, der durch Ultraschallung (3 x 15 sec; 50 W) aus einem parallelen Zellansatz freigesetzt wurde.

2.2.2.2. Bildung von Sauerstoffradikalen - *respiratory burst*

Prinzip

Die Aktivierung des *respiratory burst* wurde durch Messung des primären Reaktionsproduktes der granulozytären NADPH-Oxidase, dem Sauerstoffsuperoxid (O_2^-), quantifiziert. Die Methode von Cohen bildete die messtechnische Grundlage (163). Das Prinzip ist die fotometrische Erfassung der superoxidinduzierten Reduktion von Cytochrom-C. Vor der Stimulation der PMN wurde den Versuchsansätzen Cytochrom-C zugesetzt. Parallelansätzen wurde zusätzlich das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) hinzugefügt, das spezifisch die Sauerstoffsuperoxid-abhängige Cytochrom-C-Reduktion inhibiert. Das Ausmaß der Cytochrom-C-Reduktion, das sich aus der Differenz beider Ansätze ableitete, lies einen Rückschluss auf die Menge an gebildetem Sauerstoffsuperoxid zu.

Durchführung

Die Proben wurden paarweise angesetzt. Neben 75 µmol Cytochrom-C wurde dem Parallelansatz noch 10 µg/ml SOD hinzugefügt. Die Stimulation erfolgte 15 min lang bei 37 °C im Wasserbad und wurde durch Kühlung auf Eis beendet. Nach Abzentrifugation der zellulären Bestandteile (1200 x g; 3 min; 4 °C) erfolgte die fotometrische Analyse des reduzierten Cytochrom-C im Fotometer bei 546 nm (dem Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom-C). Die Extinktion wurde gegen den SOD-enthaltenden Parallelansatz gemessen. Die granulozytäre Sauerstoffsuperoxid-Produktion konnte dann unter Einbeziehung eines Extinktionskoeffizienten von $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei einer 1:1 Stöchiometrie berechnet werden.

2.2.3. Enzyμο-linked-immuno-sorbens-Assay (ELISA)

2.2.3.1. Prinzip: ELISA

Diese Methode wurde zur quantitativen Bestimmung der von vorbehandelten CaCo-2B-Zellen gebildeten Zytokine IL-8 und MCP-1 angewandt. Bei dieser Nachweismethode wird das Antigen mit zwei spezifischen Antikörpern markiert. Dieser Vorgang wird mit der Umsetzung eines Farbstoffes kombiniert. Durch die Verwendung spezifischer Antikörper konnte das Auftreten von Kreuzreaktionen und somit falsch positiver Ergebnisse minimiert werden.

Der 1. Antikörper war ein monoklonaler Antikörper, der selektiv an ein Epitop der gesuchten Antigene humanes IL-8 und MCP-1 bindet. Der 2. Antikörper war biotinyliert, das heißt, dass an dessen Fc-Fragment ein Biotinmolekül gekoppelt war. Auch dieser Antikörper war spezifisch für das gesuchte Antigen. Zum Nachweis des entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes wurde an diesen ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex angelagert. Das Streptavidin hat eine sehr hohe Affinität zum Biotin. Die Peroxidase war das erforderliche Enzym für die Farbstoffumsetzung. Substrat für die Peroxidase war H_2O_2 , das zusammen mit dem Farbstoff eingesetzt wurde. Aus H_2O_2 entstand enzymatisch O_2 , das den Farbstoff oxidiert. Die Folge war eine Farbentwicklung. Die Intensität dieser Farbentwicklung war abhängig von der Menge des umgesetzten Substrates. Aufgrund des stöchiometrischen Verhältnisses von 1:1 zwischen Antigen-Antikörper-Komplex und Streptavidin-Peroxidase-Komplex, war die Antigen-Menge der limitierende Faktor für den oxidativen Umsatz des Farbstoffes. Die Intensität der Farbentwicklung war somit direkt proportional zur Antigen-Menge. Sie wurde fotometrisch durch Messung der Absorption bei 405 nm bestimmt.

Der Assay wurde in 96-Well Maxisorb-Platten durchgeführt. Die speziellen Oberflächeneigenschaften dieser Platten ermöglichten die Fixierung des 1. Antikörpers an der Welloberfläche.

Die Antikörper, die Proben und der Farbstoffkomplex wurden im Überschuss eingesetzt. Nicht gebundene Anteile wurden vor dem Auftragen der nachfolgenden Substanz durch dreimaliges Waschen der ELISA-Platte mit Waschpuffer (200 μ l/Well) entfernt.

Die untersuchten Proben waren Zellüberstände, die nach 24-stündiger Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit $TNF\alpha$, IL-1 β und $IFN\gamma$ bzw. LPS abgenommen wurden. Gelagert wurden die Proben bei -20 °C. Die Vorbereitung der Proben und der Antikörper für den ELISA erfolgte bei 4 °C auf Eis.

2.2.3.2. Durchführung

Präparation der ELISA-Platte

24 Stunden vor Durchführung des ELISA erfolgte die Präparation der ELISA-Platte mit dem 1. Antikörper. Der Antikörper wurde mit PBS^{-/-} 1 x auf eine Konzentration von 4 µg/ml verdünnt und 100 µl dieser Lösung in jedes Well der ELISA-Platte pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei Raumtemperatur.

Die stabile Fixierung des 1. Antikörpers auf der Oberfläche der Versuchsplatte erfolgte mit dem Blockpuffer (300 µl/Well). Die Einwirkzeit dieses Puffers betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur. Während dessen wurden die Proben bei Bedarf mit Diluent verdünnt und die Standardverdünnungsreihe laut Protokoll hergestellt.

Standardverdünnung:

- 10 µl(10 µg/ml) Standard + 990 µl Diluent = 100 ng/ml
 - 100 µl der Verdünnung + 900 µl Diluent = 10.000 pg/ml
- weiter nach Bedarf

Assay-Procedere

Von den Standardproben und den zu untersuchenden Proben wurden jeweils 100 µl pro Well benötigt. Die Standardwerte wurden als Doppelwerte aufgetragen, beginnend mit der niedrigsten Konzentration. Die Probeninkubation dauerte 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Zugabe des biotinylierten 2. Antikörpers. Das Antikörper-Aliquot (100 µl; 20 µg/ml) wurde mit 10 ml Diluentpuffer verdünnt. Dies entsprach einer Endkonzentration von 100 ng/ml. Von dieser Lösung wurden 100 µl in jedes Well der ELISA-Platte pipettiert. Die Inkubationszeit betrug bei Raumtemperatur erneut 2 Stunden. Nachfolgend wurden 2,5 µl HRP-Streptavidin mit 10 ml Diluent verdünnt und jeweils 100 µl pro Well aufgetragen. Die Einwirkzeit war 20 Minuten. Der letzte Schritt bestand in der Zugabe von Farbstoff und Substrat. 14 mg ABTS wurden in 21 ml Substratpuffer gelöst. Kurz vor dem Auftragen wurde dieser Lösung 14 µl H₂O₂ zugegeben und nachfolgend 200 µl in jedes Well pipettiert. Lichtgeschützt erfolgte die Inkubation bis zur gewünschten Farbentwicklung. Die Bestimmung der optischen Dichten erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader.

Auswertung

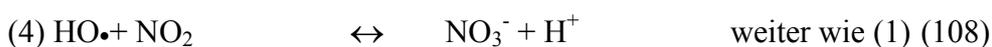
Basis der Auswertung waren die Standardwerte. Den vorgegebenen Konzentrationen der untersuchten Zytokine entsprachen bestimmte optische Dichten. Diese Werte grafisch dargestellt, bildeten die Standardkurve. Mit diesen Werten als Grundlage konnte aus den optischen Dichten der einzelnen Proben deren Zytokingehalt ermittelt werden.

2.2.4. Erfassung oxidativer Endprodukte des NO

2.2.4.1. Prinzip

NO ist in sauerstoffhaltigen Flüssigkeiten chemisch instabil und unterliegt rascher Oxidation zu den stabilen Endprodukten Nitrat und Nitrit (zusammengefasst als NO_x). Zur Erfassung dieser Oxidationsprodukte wurde eine Methode angewendet, bei der NO_x durch ein starkes Reduktionsmittel quantitativ zu NO reduziert und anschließend mittels Chemilumineszenz detektiert wird. Die theoretischen Grundlagen lieferten Untersuchungen von Cox et al. und Braman et al. (164,165). Von den möglichen Reduktionsmitteln Fe(II), Mo(VI), Ti(III) und V(III) kam V(III) zum Einsatz, da es gegenüber den anderen Substanzen entscheidende Vorteile aufweist. V(III) reagiert schneller als Fe(II) und kann bei weit niedrigerer Säurestärke der Reaktionslösung eingesetzt werden. Des Weiteren können größere Mengen an Probenlösungen gemessen werden, da V(III) im Unterschied zu Fe(II) nicht ständig erneuert werden muss, sondern auch in niedriger Konzentration ONNO⁻, NO₂⁻, NO₃⁻ quantitativ zu NO reduziert. Stärkere Reduktionsmittel wie z.B. Ti(III) setzten Nitrate und Nitrite zum Ammoniumion um, das der Detektion durch Chemilumineszenz entgeht (166).

In der Reaktionskammer kommt es bei einer Temperatur von ca. 85 °C in Anwesenheit von V(III) und konzentrierter Salzsäure zu folgenden Redoxreaktionen:



Elektronendonator ist das Reduktionsmittel V(III), das dadurch in eine höhere Oxidationsstufe übergeht.

2.2.4.2. Aufbau des Chemilumineszenzdetektors

Zur Anwendung kam der Chemilumineszenzdetektor UPK 3100®. Das Messgas passierte auf dem Weg zu einer Glaskapillare (200 ml/min) vorab einen Messgasfilter. Zwei Magnetventile dienten der Zuschaltung des Kalibriergas- bzw. des Nullgaseingangs. Über ein drittes Magnetventil konnte ein mit reinem Kohlenstoff gefüllter Konverter zugeschaltet werden, der die im Messgas vorhandenen Stickoxide (NO_x) katalytisch zu NO reduzierte. Nach Passage einer strömungsbegrenzenden Glaskapillare erreichte das Messgas die Reaktionskammer, in der es mit Ozon zusammentraf. Das Ozon wurde aus Raumluft durch einen Ozongenerator erzeugt, der nach der Methode der stillen elektrischen Ladung arbeitete. Die Raumluft wurde zuvor mit einem Permeationstrockner und weiteren Trockenmitteln von Feuchtigkeit befreit. Über eine Glaskapillare (50 ml/min) wurde das Ozon im Überschuss der Reaktionskammer zugeführt. Die Strömung der beiden Gasflüsse wurde durch eine Vakuumpumpe aufrechterhalten. Mit dieser Pumpe wurde auch ein Vakuum von -0,8 bis -1,0 bar in der Reaktionskammer erzeugt, in der die Reaktion $\text{NO} + \text{O}_3$ zu angeregtem NO_2^* stattfand. Zur Vermeidung von Kondensatbildung wurde die Reaktionskammer auf 45 °C temperiert. Nach vollzogener Reaktion verließ das Messgas-Ozon-Gemisch den Detektor über einen Aktivkohlefilter, der das überschüssige Ozon vernichtete. Die vom angeregten NO_2^* emittierten Photonen wurden gefiltert, in einem Fotomultiplier verstärkt und in ein Stromsignal umgewandelt. Der Fotomultiplier lieferte einen Ausgangsstrom im pA- bis μA -Bereich, der mit folgender Gleichung in eine Konzentration umgerechnet wurde: $c = K \times (I_{\text{pmt}} - N)$. K war der Kalibrierfaktor, I_{pmt} der Strom des Fotomultipliers und N der Nullwert. N und K wurden beim Kalibriervorgang ermittelt.

Der Lichtfilter war ein ISO-9001 DT Red-Filter (Optic Balzers AG, Balzers, Lichtenstein). Dieser bestand aus Borosilikatglas und wies folgende Spezifikationen auf:

- $T < 1 \%$ bei 400 - 570 nm
- $T = 50 \%$ bei 600 +/- 10 nm
- $T > 90 \%$ bei 630 - 760 nm

Da angeregtes NO_2^* keine Strahlung unter 600 nm emittiert, minimierte dieser Lichtfilter mögliche Interferenzen mit anderen Gasen, ohne die Sensitivität der Chemilumineszenzreaktion nennenswert zu reduzieren (168).

Als Fotomultiplier wurde ein Head-On R374 Fotomultiplier (Hamamtsu, Herrsching, Deutschland) eingesetzt, der Photonen im Bereich von 185-850 nm verstärkte.

2.2.4.3. Deproteinierung der Proben

Die untersuchten Proben waren Zellüberstände, die nach 24-stündiger Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ bzw. LPS abgenommen wurden. Gelagert wurden die Proben bis zur Messung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

400 μl der Probe wurde in ein 2 ml Eppendorfcup vorgelegt. Nachfolgend wurde je 800 μl 0,5 M NaOH- und 800 μl 30 %ige ZnSO_4 -Lösung hinzugegeben. Die Homogenisierung des Cupinhalts erfolgte über 15 min auf einem Rüttler. Durch anschließende 10-minütige Zentrifugation bei 13000 U/min wurde das gebundene Protein abgetrennt. Für die NO-Messung wurden 600 μl des proteinfreien Überstandes benötigt.

Die Eichlösungen wurden wie die Proben behandelt.

2.2.4.4. Versuchsablauf

Die Reduktion erfolgte in einem beheizbaren Reaktionsgefäß mit einer Kapazität von 150 ml und einer Glasfritte (Porengröße 3), die sich im Boden des Gefäßes befand. Durch die Fritte wurde das inerte Trägergas N_2 in die Reaktionskammer geleitet. Das entstehende NO wurde durch einen Jacket-Intensivkühler und eine Kühlfalle zum Chemilumineszenzdetektor transportiert. Der Kühler und die Kühlfalle dienten der Kondensation des Wasserdampfes sowie der Salzsäure. Sie verhinderten dadurch eine Beschädigung des Detektors.

Mittels eines Mikrometerventils konnte der N_2 -Gasfluß an den Messgasvolumenfluss (200 ml/min) im Detektor angepasst werden. Ein T-förmiger Überlauf ermöglichte die exakte Justierung und verhinderte einen Überdruck am Messgaseingang des Detektors. Die Probe (600 $\mu\text{l}/\text{min}$) wurde der Reaktionskammer mittels einer Rollerpumpe durch eine dünne Teflonkapillare (Innendurchmesser 1mm) zugeführt. Parallel dazu wurde durch eine zweite Kapillare kontinuierlich Reaktionslösung entnommen, um so ein Überlaufen der Reaktionskammer zu verhindern. Das große Volumen der Reaktionskammer ermöglichte die Messung vieler Proben, ohne dass die Notwendigkeit zur Erneuerung der VCl_3 -Lösung bestand.

Die Kalibrierung der Messanordnung erfolgte mit Standards bekannter Nitrat- bzw. Nitritkonzentration. Die verwendeten Standardkonzentrationen waren 0,1, 10 und 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$. Die Analyse des Messgases erfolgte mittels Chemilumineszenz; die Daten wurden mit einem Pascal-Programm erfasst (© Mayer K. 1995).

Der NO-Gehalt einer Probe errechnete sich aus der Differenz zwischen dem gemessenen NO-Höchstwert der Probe und dem „Basiswert“ der Anlage. Um den Einfluss von zu großen Messwertschwankungen so gering wie möglich zu halten, wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung des NO-Gehaltes durchgeführt.

Die Umrechnung der gemessenen NO-Werte in $\mu\text{mol/l}$ erfolgte aus der Gleichung der Eichgerade. Diese Eichgerade wurde aus den gemessenen NO-Werten der Standard-Proben mit bekannter Nitrat-/Nitritkonzentration ermittelt.

2.2.5. Analytik der Arachidonsäure-Metaboliten

Grundlage für den Nachweis der Arachidonsäure-Metaboliten war eine Sequenz aus Festphasenextraktion und HPLC-Analytik, wobei die HPLC-Technik durch UV-Spektrenanalyse der separierten Arachidonsäure-Metaboliten ergänzt wurde (169).

2.2.5.1. Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion diente der Aufreinigung und Anreicherung der granulozytären Arachidonsäure-Derivate aus dem Zellüberstand. Verwendet wurden 1 cm^3 Vorsäulen (Bond-Elut, Leverkusen, Deutschland) aus einer Silica-Gel Matrix. Die Gel-Matrix war kovalent mit gesättigten C-18-Alkylresten verbunden. Die wichtigste Eigenschaft dieser Matrix war ihre hohe Affinität zu unpolaren Verbindungen. Dies ermöglichte die Extraktion der Lipoxygenase-Metaboliten aus dem wässrigen Zellüberstand und deren nachfolgende Elution durch Zugabe eines unpolaren Lösungsmittels (Methanol).

Die verwendeten Lösungen und Proben waren eisgekühlt. Die Säulen wurden auf eine Vakuumkammer gesetzt. Diese war an eine Saugpumpe angeschlossen, um die Elution der Flüssigkeiten zu beschleunigen.

Der erste Schritt der Festphasenextraktion war die Konditionierung der Säulen durch Zugabe von zweimal jeweils 1 ml Methanol und 1 ml Aqua dest.. Danach wurden die eisgekühlten Zellüberstände aufpipettiert und langsam durchgesaugt. Durch das nachfolgende zweimalige Waschen der Säulen mit Aqua dest. wurden retinierte polare Verbindungen von der Säule gespült. Anschließend wurde durch rasches Durchsaugen von $100\ \mu\text{l}$ Chloroform je Säule die wässrige Phase vollständig von der Säule verdrängt. Die Elution der gebundenen Arachidonsäure-Metaboliten erfolgte durch Zugabe von $250\ \mu\text{l}$ Methanol je Säule, das langsam durchgesaugt und in Eppendorfcups aufgefangen wurde.

Die Proben wurden anschließend unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom eingedampft und bei -20 °C bis zur weiteren Analytik gelagert.

Die Wiederfindungsrate (Recovery) für die einzelnen Metaboliten, die mit diesem Verfahren erreicht werden kann, wurde in separat durchgeführten Recoveryexperimenten regelmäßig ermittelt und lag durchschnittlich bei 80 %.

2.2.5.2. HPLC-Analytik

Herstellung und Konditionierung der HPLC-Säulen

Die zur Separierung der Arachidonsäure-Metaboliten verwendeten HPLC-Säulen wurden mithilfe einer Säulen-Packvorrichtung (Knaur, Berlin, Deutschland) hergestellt. Die Leersäule war eine 25 cm lange Edelstahlsäule mit 0,46 cm Innendurchmesser. Octadecysilyl-Hypersil-5 μ -Partikel waren das Packungsmaterial. Die Herstellung der HPLC-Säulen erfolgte folgendermaßen:

Als Erstes wurden 3,8 g des Packungsmaterials in 35 ml Isopropanol in einem Glasbehälter gelöst. Die Lösung wurde 5 Minuten lang in einem Ultraschallbad behandelt, und danach in den Vorratsbehälter des Säulenpackgerätes eingefüllt, aus dem sie anschließend maschinell unter einem Druck von 440 bar in die mit Methanol gereinigte, einseitig verschlossene Leersäule gepresst wurde. Die fertige Säule wurde verschlossen und auf einer Seite mit einer Vorsäule verbunden, deren Aufgabe der Schutz der Hauptsäule vor Verunreinigungen war. Vor Inbetriebnahme war noch die Konditionierung der neuen Säule mit einem Gemisch aus Methanol und Aqua dest. (1:9) mit 0,5 %igem EDTA-Zusatz erforderlich.

Herstellung der mobilen Phase

Die mobile Phase war das Trägermaterial für die zu analysierenden Proben. Sie setzte sich aus Methanol/H₂O/Essigsäure im Verhältnis 72/28/0,16 zusammen. Die Einstellung des pH-Wertes auf 4,9 erfolgte mit 10 %igem NH₄OH. Die fertige Phase wurde mithilfe eines Ganzglas-HPLC-Filersystems (Schott, Mitterteich, Deutschland) mit einem Unterdruck von 700 mbar durch eine Teflonmembran gesogen und so von partikulären Verunreinigungen befreit.

Reversed-Phase-HPLC (isokratisch)

Mathews et al beschrieben erstmals dieses Trennverfahren (170). Zum Einsatz kam eine modifizierte Form. Die für diese Methode entwickelte Anlage, HLPC-System Gynkotek Model GINA 160, setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- Spektroflow 773 UV Detektor (Waters/Millipore, Eschborn, Deutschland)
- Gynkothek M 600 Pumpe (Gynkotek, München, Deutschland)
- Shimadzu-Integrator (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- Rheodyne-Probenaufgabeventil (Latek KG, Eppelheim, Deutschland)

Die Arachidonsäure-Metaboliten aus den Zellüberständen wurden folgendermaßen quantifiziert: Die eingedampften Proben wurden in 50 µl Methanol aufgenommen und gründlich gemischt, um an der Wand haftende Probenbestandteile zu resuspendieren. Nach Zentrifugation (1000 x g; 2 Minuten) gab man 20 µl der Probe mittels einer Hamilton-Spritze über das Probenaufgabeventil auf die Säule. Die Probenelution erfolgte bei einer konstanten Durchflussrate von 1,3 ml mobiler Phase/min bei einem Druck von ca. 180 bar. Mit dieser Methode war eine sehr gute Einzeldarstellung von LTB₄, der LTA₄-Abbauprodukte 6-trans-LTB₄, 6-trans-epi-LTB₄, 5,6-di-HETE, 5,6-epi-di-HETE und 5-HETE möglich. Dagegen war die Einzeldarstellung der Abbauprodukte von LTB₄ ω-OH-LTB₄ und ω-COOH-LTB₄ wegen Koelution weniger deutlich. Die Analyse der Leukotriene erfolgte bei 270 nm, während 5-HETE nur bei einer Wellenlänge von 237 nm detektiert werden konnte.

Grundlage dieser Methode war das unterschiedliche Affinitätsverhalten der einzelnen Arachidonsäure-Metaboliten gegenüber der stationären Phase (Säule), sodass die Elution der einzelnen Leukotriene von der Säule nach ganz bestimmten Zeiten erfolgte. Die Identifikation war durch Vergleich mit den Retentionszeiten isolierter Standards möglich, die regelmäßig parallel zu den Proben analysiert wurden. Die Menge der retinierten Metabolite wurde über den Shimadzu-Integrator bestimmt und unter Einbeziehung vorliegender Response- u. Recoverydaten in ng/ml umgerechnet.

UV-Spektrenanalyse

Ein weiteres Kriterium zur Identifizierung der einzelnen 5-LO-Metaboliten bildete die Bestimmung der UV-Spektren der eluierten Komponenten des Zellüberstandes. Dazu war der HPLC-Anlage ein Fotodiodenarray-Detektor (Waters/Millipore, Eschborn, Deutschland) nachgeschaltet. Das charakteristische dreigipflige UV-Spektrum der Leukotriene wurde als Identifikationskriterium herangezogen. Dieses Verfahren diente der

sensitiven Erfassung von Verunreinigungen und trug somit wesentlich zur Charakterisierung der Metaboliten bei.

2.2.6. Kultivierung der CaCo-2 Zellen

Die verwendeten Zellen wurden von der Firma WAK-Chemie bezogen. Die Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem CO₂-Inkubator bei 5 % CO₂-Begasung und 37 °C. Das Passagieren der Zellen, der Wechsel der Nährlösung sowie die Versuchsvorbereitung erfolgte ebenfalls unter sterilen Bedingungen in einer Flow-Bench. Durchgeführte mikrobiologische Untersuchungen erbrachten keinen Hinweis auf eine Infektion mit Mykoplasmen oder anderen Keimen.

Die Kultivierung der CaCo-2B Zellen erfolgte in T-75-Zellkulturflaschen, in denen sich jeweils 20 ml Kulturmedium befanden. Täglich erfolgte die mikroskopische Untersuchung der Zellen und jeden zweiten Tag der Wechsel des Nährmediums. Bei Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde zunächst das alte Medium abgesaugt. Danach wurden die Zellen zweimal mit 10 ml Dulbecco's MEM gewaschen. Nachfolgend wurden ca. 8 ml Trypsin-Gebrauchslösung in jede Zellkulturflasche appliziert, und diese dann für einige Minuten in den CO₂-Inkubator zurückgestellt. Durch das Trypsin lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Anschließend wurde die Trypsinlösung mit einer sterilen Pipette aufgenommen und in sterile 50 ml-fassende Röhren pipettiert, die 1 ml fetales Kälberserum (FCS) enthielten. Das FCS fungierte als Trypsin-Inhibitor. Mit jeweils 15 ml Dulbecco's MEN wurden die T-75-Zellkulturflaschen gespült, um verbliebene Zellen aufzunehmen. Dieses Volumen wurde in die entsprechenden Röhren gegeben. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 37 °C und 248 x g zentrifugiert. Die Anlaufzeit der Zentrifuge betrug 30 Sekunden, die Ablaufzeit 1 Minute (Bremsen 9). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in Nährmedium resuspendiert. Für die Versuche wurde das Volumen so gewählt, dass auf einer 12-Well-Platte etwa 4×10^5 Zellen/Well ausgesät wurden. Für die Passage der Stammkulturen wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 oder höher verdünnt ausgesät.

Die Zellen auf den Versuchsplatten wurden täglich mikroskopiert und jeden zweiten Tag erfolgte ein Wechsel der Nährlösung. Pro Well einer 12-Well-Platte wurden 2 ml Medium aufgetragen. Nach 1 - 3 Tagen erreichten die Zellen das Stadium der vollständigen Konfluenz. Die Versuche wurden dann am 6. postkonfluenten Tag durchgeführt.

2.2.7. Experimentelles Protokoll

2.2.7.1. Vorbehandlung der CaCo-2 Zellen

24 Stunden vor den Versuchen wurden die CaCo-2B-Zellen entsprechend dem Versuchsprotokoll mit den Zytokinen TNF α , IL-1 β und INF γ bzw. mit LPS in folgenden Konzentrationen vorbehandelt:

- TNF α : 1 ng/ml, 10 ng/ml
- Zytokinmix: 10 ng/ml TNF α , 100 U/ml INF γ , 0,5 ng/ml IL-1 β
- Zytokinmix-high: 10 ng/ml TNF α , 1000 U/ml INF γ , 5 ng/ml IL-1 β
- LPS: 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml

Als Erstes wurde das Nährmedium abgesaugt und anschließend die Zellen zweimal mit H/H^{+/+} 1 ml/Well gewaschen.

Die zur Stimulation eingesetzten Mediatoren wurden in Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Herstellung der Stammlösung und nachfolgender Verdünnungsstufen erfolgte mit einem modifizierten Nährmedium, das nur 1 % FCS enthielt, um die Proteinbindung der Stimulationssubstanzen so gering wie möglich zu halten. Diese Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen auf Eis mit einem vorgekühlten Medium.

Nach Auftragen der Stimulationssubstanzen wurde das Volumen in den einzelnen Wells mit dem modifizierten Nährmedium auf 1 ml/Well ergänzt. Die CaCo-2B-Zellen inkubierten danach 24 Stunden im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.7.2. Versuchsablauf

Zwei Stunden vor der Durchführung des Versuches wurde das Nährmedium mit den Stimulationssubstanzen abgesaugt und die CaCo-2B-Zellen zweimal mit HH^{+/+} 1 ml/Well gewaschen. Dann wurde erneut HH^{+/+} 1 ml/Well auf die Zellen aufgetragen und diese bei 37 °C und 5 % CO₂ im Wärmeschrank 2 Stunden inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde das HH^{+/+} abgesaugt, und die Wells entsprechend dem Versuchsaufbau vorbereitet. Für die Messung des *respiratory burst* erfolgte je nach Ansatz die Zugabe von Cytochrom-C oder Cytochrom-C/SOD-Lösung. Den Ansätzen zur Elastasebestimmung wurde kein Cytochrom-C beigegeben. In die so vorbereiteten 12-Well-Platten wurden dann jeweils 5 Millionen PMN/Well gelöst in 600 μ l HH^{+/+} hinzugegeben. Anschließend wurde das Volumen in den Wells so mit HH^{+/+} aufgefüllt, dass während der Stimulationszeit ein Gesamtvolumen von 1 ml/Well vorlag. Die gesamte Vorbereitung lief bis zu diesem Zeitpunkt unter sterilen Bedingungen ab.

Nachfolgend kamen die mit einem Deckel verschlossenen Platten für 15 Minuten bei 37 °C in ein Wasserbad. Während dieser Zeit erfolgte die Adhäsion der PMN auf der Oberfläche der CaCo-2B-Zellen. Im Anschluss wurden die Zellen gemäß dem Versuchsprotokoll mit dem Ca²⁺-Ionophor A 23187 in einer Konzentration von 1 µmol/ml und 10 µmol/ml stimuliert. Hierbei wurden die Ansätze für Mess- und Leerwert der Cytochrom-C-Reduktion gleichzeitig aktiviert. Das A 23187 wurden so in HH^{+/+} aufgenommen, dass die gewünschte Konzentration durch 100 µl Lösung erreicht wurde. Nach Zugabe des Stimulus wurden die Zellen für weitere 15 Minuten in dem Wärmebad belassen. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Platten für 5 Minuten auf Eis gekühlt, um die Reaktionen abzustoppen. Danach wurde der Inhalt der Wells mittels Eppendorf-Pipetten aufgenommen und in Eppendorf-Cups überführt. Diese wurden 2 Minuten mit 13000 U/min zentrifugiert. Aus den so gewonnenen zellfreien Überständen erfolgte die fotometrische Messung der granulozytären Sauerstoffradikal- und Elastasefreisetzung.

Zur Bestimmung der gebildeten Arachidonsäure-Metaboliten wurden die Zellüberstände, die kein Cytochrom-C bzw. Cytochrom-C/SOD-Zusatz enthielten, bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.2.8. Statistik

Alle Messwerte sind als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Zum statistischen Vergleich wurde eine ANOVA bzw. ein gepaarter T-Test durchgeführt. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Dies entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %.

3. Ergebnisse

3.1. Übersicht

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Wirkung mit proinflammatorischen Mediatoren vorbehandelter CaCo-2B-Zellen auf die destruktiven granulozytären Reaktionen sowie die granulozytäre Leukotriensynthese. Unter destruktiven granulozytären Reaktionen wurden die Freisetzung der vesikulär gespeicherten Elastase und die Induktion der Bildung von Sauerstoffradikalen subsumiert. Zunächst wird kurz die zeitliche Abfolge der Experimente erläutert, die die Gliederung des Ergebnisteils bestimmt. Nicht vorbehandelte (native) CaCo-2B-Zellen sind in der Lage, die destruktiven granulozytären Zellreaktionen abzuschwächen, wenn sowohl die PMN als auch die CaCo-2B-Zellen stimuliert werden. Der hemmende Einfluss tritt nicht auf, wenn nur die PMN in Gegenwart der CaCo-2B-Zellen aktiviert werden (160). Diese bekannte Wechselwirkung konnte in Vorversuchen reproduziert werden. Zur Zellstimulation wurde das Ca^{2+} -Ionophor A 23187, das sowohl PMN als auch CaCo-2B-Zellen stimuliert, und das bakterielle Tripeptid fMLP, als alleiniger Aktivator der Granulozyten, eingesetzt.

Basierend auf dieser Ausgangssituation wurde untersucht, ob durch Vorbehandlung mit proinflammatorischen Mediatoren der supprimierende Effekt von CaCo-2B-Zellen auf die destruktiven granulozytären Reaktionen aufhebbar ist. In einer ersten Versuchsreihe wurden die CaCo-2B-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ inkubiert. Da im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens stets mehr als ein proinflammatorischer Mediator beteiligt ist, erfolgte in einer zweiten Versuchsreihe die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit einer Zytokinkombination bestehend aus $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β und IFN γ . In einer dritten Versuchsreihe wurden schließlich die CaCo-2B-Zellen mit LPS als proinflammatorischer Mediator bakteriellen Ursprungs vorbehandelt.

Gleichzeitig wurde für die zur Vorbehandlung eingesetzten Mediatoren überprüft, welchen Effekt sie auf die Synthese der Zytokine IL-8, MCP-1 sowie auf die Bildung von NO in den CaCo-2B-Zellen haben. Die Induktion der IL-8-, MCP-1- und NO-Synthese wurde als Marker für die inflammatorische Aktivierung der CaCo-2B-Zellen definiert.

Ein weiterer Schwerpunkt der Experimente bestand in der Untersuchung, ob CaCo-2B-Zellen modifizierend auf die granulozytäre Leukotriensynthese einwirken, und ob es durch die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen zu einer Änderung des nachweisbaren Leukotrienmusters bzw. der Menge der freigesetzten Leukotriene kommt.

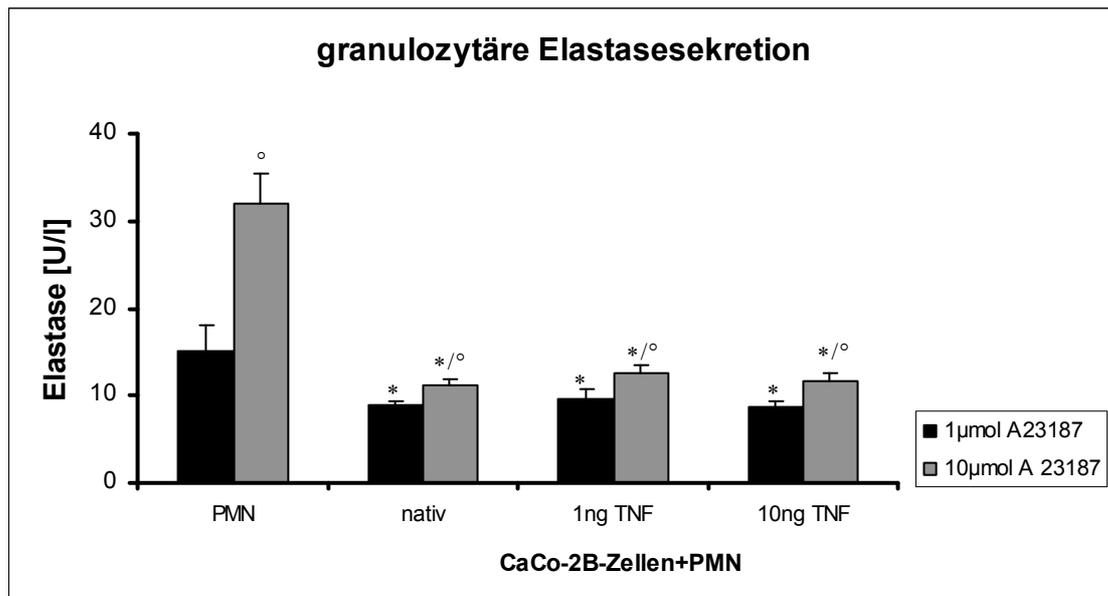
3.2. Verminderung destruktiver granulozytärer Zellreaktionen durch TNF α -vorbehandelte CaCo-2B-Zellen

TNF α -vorbehandelte CaCo-2B-Zellen bewirkten wie native CaCo-2B-Zellen eine Supprimierung destruktiver Granulozytenreaktionen nach Stimulation mit A 23187.

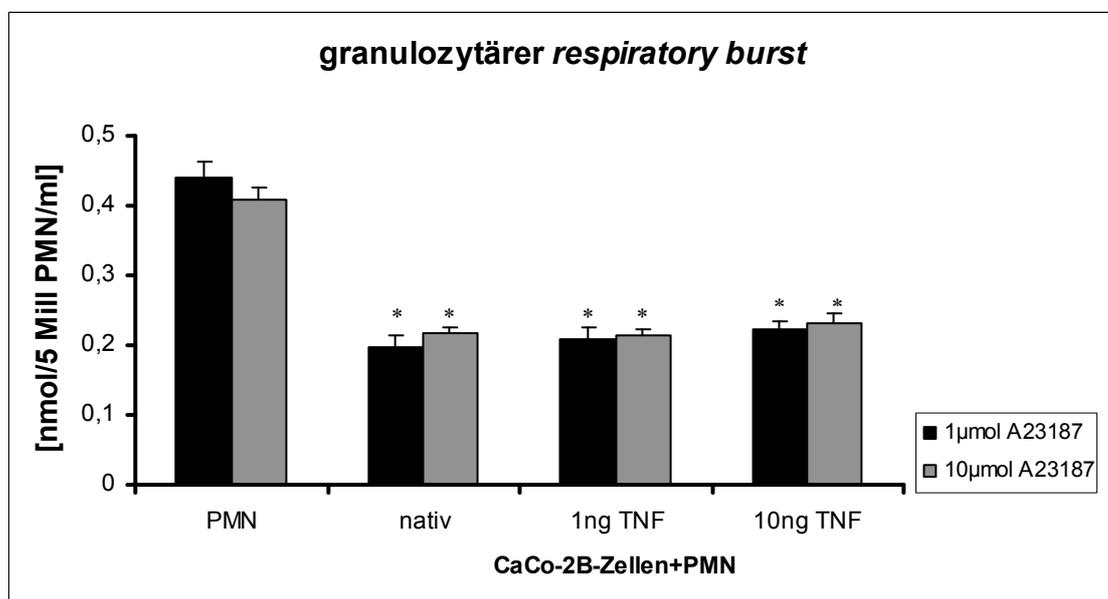
Die Freisetzung der zellulär gespeicherten granulozytären Elastase war in den Versuchsansätzen mit nativen und TNF α -vorbehandelten CaCo-2B-Zellen im Vergleich zu nicht co-inkubierten PMN nach Hinzugabe von 1 μ mol und 10 μ mol A 23187 signifikant erniedrigt ($p < 0,05$) (Grafik 1).

Parallel fand sich eine Verringerung der granulozytären Sauerstoffradikalbildung bei Co-Inkubation mit nativen bzw. TNF α -vorbehandelten CaCo-2B-Zellen (Grafik 2). Das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) wurde sowohl für die Stimulationsansätze mit 1 μ mol A 23187 als auch mit 10 μ mol A 23187 erreicht.

Der Subgruppenvergleich zeigte eine signifikant höhere granulozytäre Elastasefreisetzung ($p < 0,05$) in allen Subgruppen nach Versuchsaktivierung mit 10 μ mol A 23187 im Vergleich zu 1 μ mol A 23187 (Grafik 1). Bezüglich des granulozytären *respiratory burst* hatte die eingesetzte Konzentration des A 23187 keinen statistisch signifikanten Effekt (Grafik 2). Ein signifikanter Einfluss der zur Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen eingesetzten TNF α -Konzentration (1 ng/ml versus 10 ng/ml) auf die Elastase- und Superoxidfreisetzung co-inkubierter PMN war nicht nachweisbar (Grafik 1 und 2).



Grafik 1: Native und TNF α -vorbehandelte CaCo-2B-Zellen induzieren eine signifikante Suppression der Elastasefreisetzung co-inkubierter PMN nach Stimulation der Zellen mit 1 μ mol und 10 μ mol A 23187 (*, $p < 0,05$). Erfolgte die Versuchsaktivierung mit 10 μ mol A 23187, wurde in allen Subgruppen signifikant mehr granulozytäre Elastase freigesetzt ($^{\circ}$, $p < 0,05$). Die zur Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen eingesetzte TNF α -Konzentration hatte keinen signifikanten Einfluss auf die granulozytäre Elastasesekretion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) aus jeweils 8 Messungen.



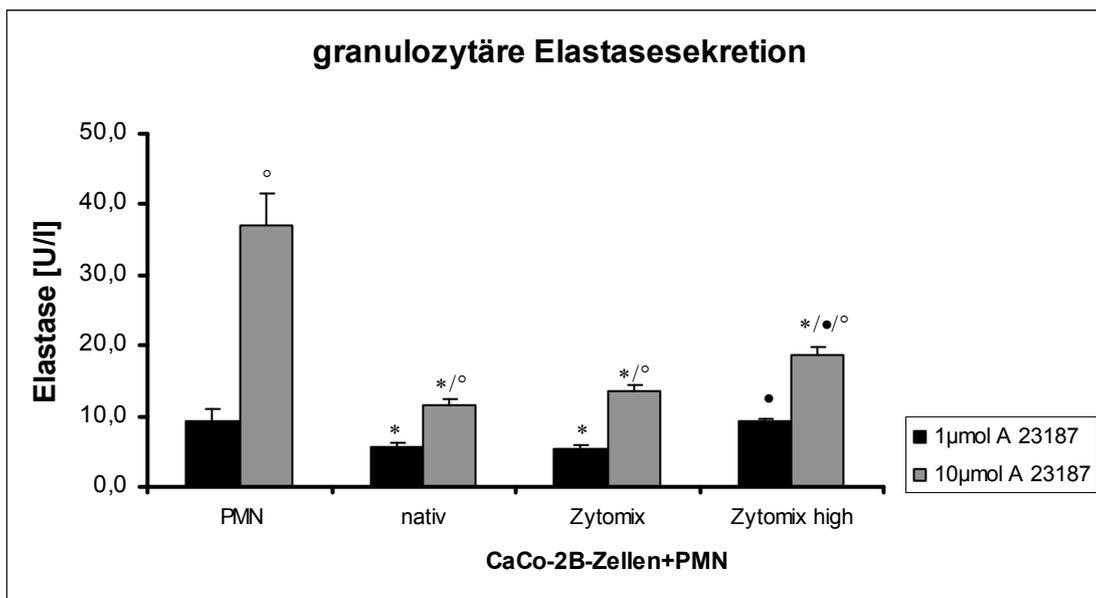
Grafik 2: TNF α -vorbehandelte CaCo-2B-Zellen bewirken wie native CaCo-2B-Zellen eine signifikante Reduktion der granulozytären Superoxidfreisetzung (*, $p < 0,05$) nach Stimulation mit 1 μ mol und 10 μ mol A 23187. Die zur Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen eingesetzte TNF α -Konzentration bzw. die Konzentration des A 23187 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die granulozytäre Superoxidfreisetzung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 8 Messungen.

3.3. Suppression destruktiver granulozytärer Zellreaktionen durch Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $IFN\gamma$

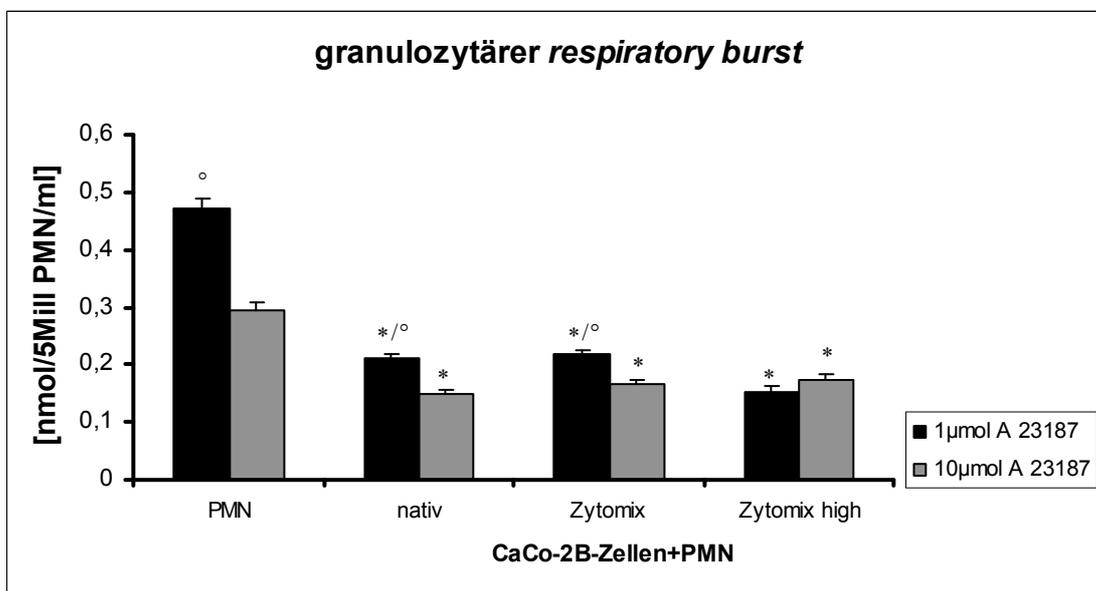
Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit den Zytokinen $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $IFN\gamma$ bewirkte keine Aufhebung des supprimierenden Einflusses auf die destruktiven Granulozytenreaktionen.

Auch unter diesen Versuchsbedingungen zeigte sich im Vergleich zu nicht co-inkubierten PMN die bekannte Reduktion der granulozytären Elastasefreisetzung co-inkubierter PMN nach Stimulation der Versuchsansätze mit 1 μmol und 10 μmol A 23187 (Grafik 3). Lediglich im Versuchsansatz mit der hohen Zytokinkonzentration wurde nach Hinzugabe von 1 μmol A 23187 das geforderte Signifikanzniveau ($p < 0,05$) für die Suppression nicht erreicht. In den Ansätzen, in denen die CaCo-2B-Zellen mit der hohen Zytokinkonzentration vorbehandelt wurden, fand sich nach Applikation von 1 μmol und 10 μmol A 23187 eine signifikant höhere Elastasefreisetzung ($p < 0,05$) co-inkubierter PMN im Vergleich zur Vorbehandlung mit der niedrigeren Zytokinkonzentration und zu nativen CaCo-2B-Zellen. Des Weiteren zeigte sich eine statistisch signifikant höhere Elastasefreisetzung ($p < 0,05$) in allen Untergruppen nach Hinzugabe von 10 μmol A 23187 im Vergleich zu 1 μmol A 23187 (Grafik 3).

Die Bestimmung der granulozytären Superoxidbildung präsentierte die bekannte Verminderung bei Co-Inkubation der PMN mit nativen und den Zytokin-vorbehandelten CaCo-2B-Zellen (Grafik 4). Die Konzentration der zur Vorbehandlung eingesetzten Mediatoren war ohne signifikanten Einfluss auf den granulozytären *respiratory burst*. Erfolgte die Aktivierung mit 1 μmol A 23187 zeigte sich, außer in der Subgruppe Zytokinmix-high, eine signifikant höhere Superoxidsynthese ($p < 0,05$) der PMN im Vergleich zur Stimulation 10 μmol A 23187 (Grafik 4).



Grafik 3: Statistisch signifikante Reduktion (*, $p < 0,05$) der Elastasefreisetzung co-inkubierter PMN, außer in der Kombination Zytokinmix-high und 1 µmol A 23187. PMN, die mit Zytokinmix-high-vorbehandelten CaCo-2B-Zellen inkubiert wurden, sezernierten signifikant mehr Elastase, als bei Inkubation mit nativen und Zytokinmix-vorbehandelten CaCo-2B-Zellen (•, $p < 0,05$). Die Applikation von 10 µmol A 23187 bewirkte eine signifikante höhere Elastasefreisetzung in allen Subgruppen (°, $p < 0,05$) im Vergleich zur Stimulation mit 1 µmol A 23187. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus je 8 Messungen.



Grafik 4: Zytokinmix-vorbehandelte und native CaCo-2B-Zellen induzieren eine signifikante Reduktion der granulozytären Superoxidfreisetzung (*, $p < 0,05$) co-inkubierter PMN im Vergleich zu nicht co-inkubierten PMN. Erfolgte die Aktivierung mit 1 µmol A 23187, zeigte sich außer in der Subgruppe Zytokinmix-high eine signifikant höhere Superoxidsynthese (°, $p < 0,05$) der PMN im Vergleich zur Stimulation 10 µmol A 23187. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus 8 Messungen.

3.4. Einfluss der Zytokine $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $IFN\gamma$ auf die MCP-1- und IL-8-Synthese in CaCo-2B-Zellen

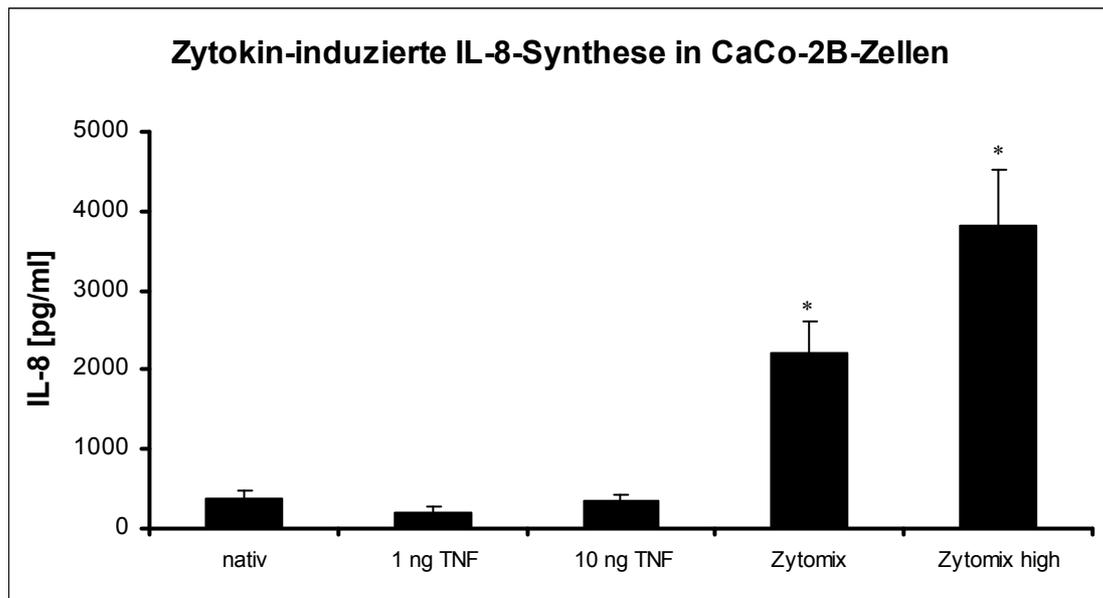
Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit $TNF\alpha$ hatte keine signifikante induktive Wirkung auf die MCP-1- und IL-8-Synthese.

Die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit 1 ng/ml $TNF\alpha$ und 10 ng/ml $TNF\alpha$ zeigte keinen signifikanten Einfluss ($p > 0,05$) auf die IL-8-Synthese, gegenüber der IL-8-Synthese nativer CaCo-2B-Zellen (Grafik 5).

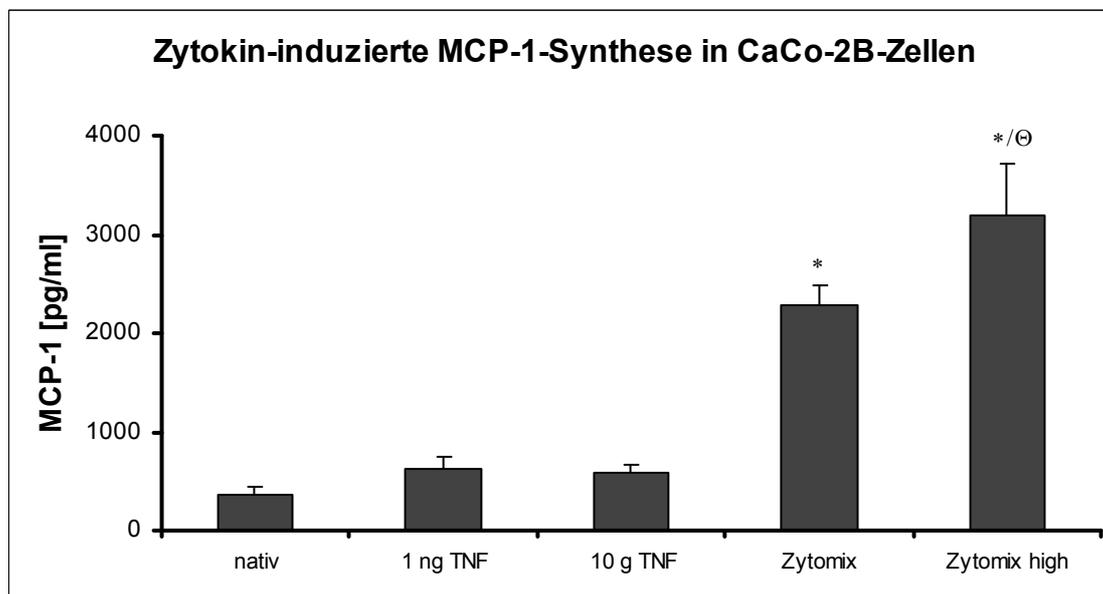
Die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit $TNF\alpha$ in einer Konzentration von 1 ng/ml und 10 ng/ml bewirkte eine nicht signifikante Steigerung ($p > 0,05$) der MCP-1-Synthese im Vergleich zur MCP-1-Synthese nicht vorbehandelter CaCo-2B-Zellen (Grafik 6).

Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit einem Mix der Zytokine $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $INF\gamma$ führte zur signifikanten Amplifikation der MCP-1- und IL-8-Synthese der CaCo-2B-Zellen.

Die 24-stündige Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit dem Zytokinmix in beiden Konzentrationen führte zu einer deutlichen Steigerung der MCP-1- und IL-8-Synthese. Nach Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit dem Zytokinmix war für MCP-1 eine etwa 6-fach ($p < 0,05$) und für IL-8 eine 8-fach ($p < 0,05$) höhere Zytokinkonzentration gegenüber den entsprechenden Zytokinkonzentrationen nativer CaCo-2B-Zellen nachweisbar (Grafik 5 und 6). Eine Stimulation der CaCo-2B-Zellen mit dem Zytokinmix in hoher Konzentration führte zu einer weiteren Steigerung der Synthese von IL-8 und MCP-1, wobei diese gegenüber der niedrigen Konzentration nur für MCP-1 signifikant ($p < 0,05$) war (Grafik 5 und 6).



Grafik 5: Die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit TNF α in den Konzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die IL-8-Synthese. Die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit den Zytokinmischen führte jeweils zur signifikanten Zunahme der IL-8-Synthese (*, $p < 0,05$), wobei die weitere Zunahme der IL-8-Synthese bei Stimulation mit der hohen Zytokinkonzentration nicht signifikant war. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 8 Messungen.



Grafik 6: Die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit TNF α in der Konzentration 1 ng/ml und 10 ng/ml bewirkte jeweils eine nicht signifikante Steigerung der MCP-1-Synthese. Die Stimulation der CaCo-2B-Zellen mit den Zytokinmischen führte zur signifikanten Zunahme der MCP-1-Synthese (*, $p < 0,05$). Die weitere Zunahme der MCP-1-Synthese bei Zusatz der hohen Zytokinkonzentration war signifikant (Θ , $p < 0,05$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 8 Messungen pro Stimulationsansatz.

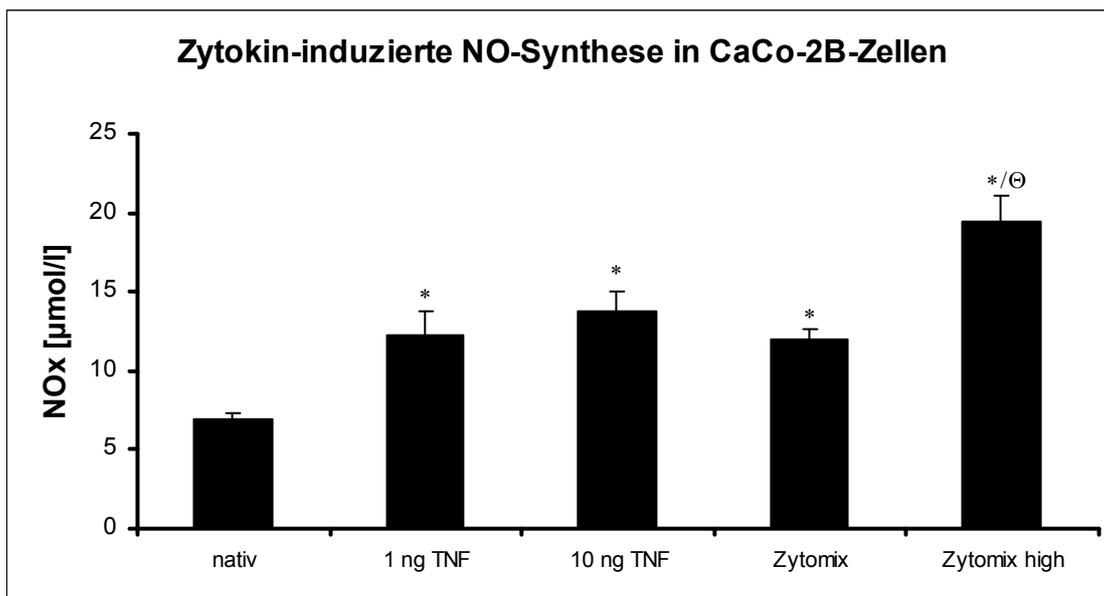
3.5. Untersuchung zum Einfluss der Zytokine $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $INF\gamma$ auf die NO-Synthese in CaCo-2B-Zellen

Die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit $TNF\alpha$ hatte einen stimulierenden Einfluss auf die NO-Synthese.

Bestimmt wurde der Gehalt an NOx im Zellüberstand nach 24-stündiger Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit $TNF\alpha$. Es zeigte sich, dass 1 ng/ml $TNF\alpha$ und 10 ng/ml $TNF\alpha$ einen induktiven Effekt auf die NO-Synthese der CaCo-2B-Zellen hatten. Das geforderte Signifikanzniveau ($p < 0,05$) wurde jeweils erreicht (Grafik 7). Eine Steigerung der $TNF\alpha$ -Konzentration im Stimulationsansatz auf 10 ng/ml bewirkte eine weitere, jedoch nicht signifikante, Erhöhung des nachgewiesenen NOx im Zellüberstand.

Die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit den Zytokinen $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $INF\gamma$ hatte einen induktiven Effekt auf die NO-Synthese.

Die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit den Zytokinen $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $INF\gamma$ führte zur signifikanten Zunahme von NOx im Zellüberstand ($p < 0,05$) (Grafik 7). Nach Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit dem Zytokinmix war die nachgewiesene NOx-Konzentration etwa 1,7-fach so hoch, wie die NOx-Konzentration im Zellüberstand der Kontrollzellen. Wurden die Zellen mit der hohen Konzentration des Zytokinmixes vorbehandelt, konnte eine 2,8-fach über dem Kontrollwert liegende NOx-Konzentration im Zellüberstand nachgewiesen werden. Gegenüber dem niedrig dosierten Zytokingemisch war die weitere Zunahme des nachgewiesenen NOx nach Applikation der hohen ZytokinKonzentration signifikant ($p < 0,05$) (Grafik 7).



Grafik 7: Die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit 1 ng/ml und 10 ng/ml TNF α führte zur signifikanten Zunahme (*, $p < 0,05$) deren NO-Synthese. Die Steigerung der TNF α -Konzentration von 1 ng/ml auf 10 ng/ml führte zur nicht signifikanten weiteren Zunahme des nachgewiesenen NOx. Die Stimulation der CaCo-2B-Zellen mit den Zytokinmischen bewirkte eine signifikante Zunahme des im Zellüberstand nachgewiesenen NOx (*, $p < 0,05$). Hier führte die Erhöhung der eingesetzten Zytokinkonzentrationen (Zytokinmix-high) zur signifikanten weiteren Zunahme der NO-Synthese der CaCo-2B-Zellen (Θ, $p < 0,05$). Für jeden Stimulationsansatz wurden 5 Messungen durchgeführt.

3.6. Suppression destruktiver granulozytärer Zellreaktionen durch LPS-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen

Die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit LPS bewirkte eine Abnahme der granulozytären Superoxidbildung, bei der Elastasefreisetzung zeigte sich ein differenziertes Bild nach Applikation von 1 μ mol und 10 μ mol A 23187.

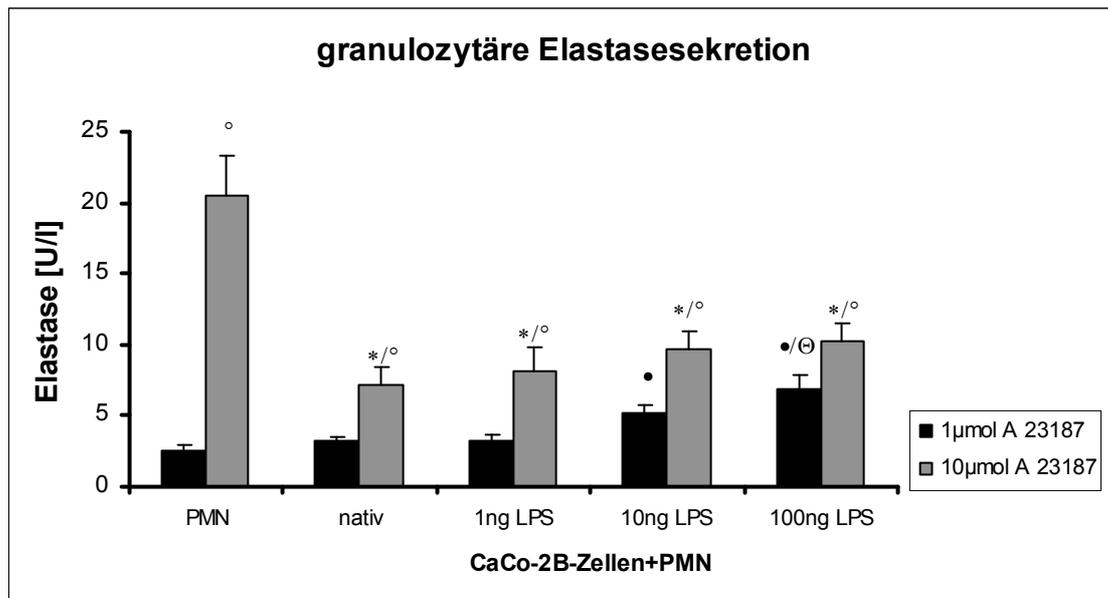
Es erfolgte entsprechend dem bekannten Versuchsablauf die 24-stündige Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit LPS in einer Konzentration von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml.

Bei der Bestimmung der granulozytären Elastase präsentierte sich ein differenziertes Bild. Im Versuchsaarm mit Applikation von 10 μ mol A 23187 zur Aktivierung zeigte sich eine signifikante Suppression ($p < 0,05$) der Elastasefreisetzung bei den co-inkubierten PMN im Vergleich zu nicht co-inkubierten PMN (Grafik 8). Die Subgruppenanalyse erbrachte, dass der Anstieg der Elastasefreisetzung co-inkubierter PMN in Beziehung zur ansteigenden LPS-Konzentration das statistische Signifikanzniveau nicht erreichte.

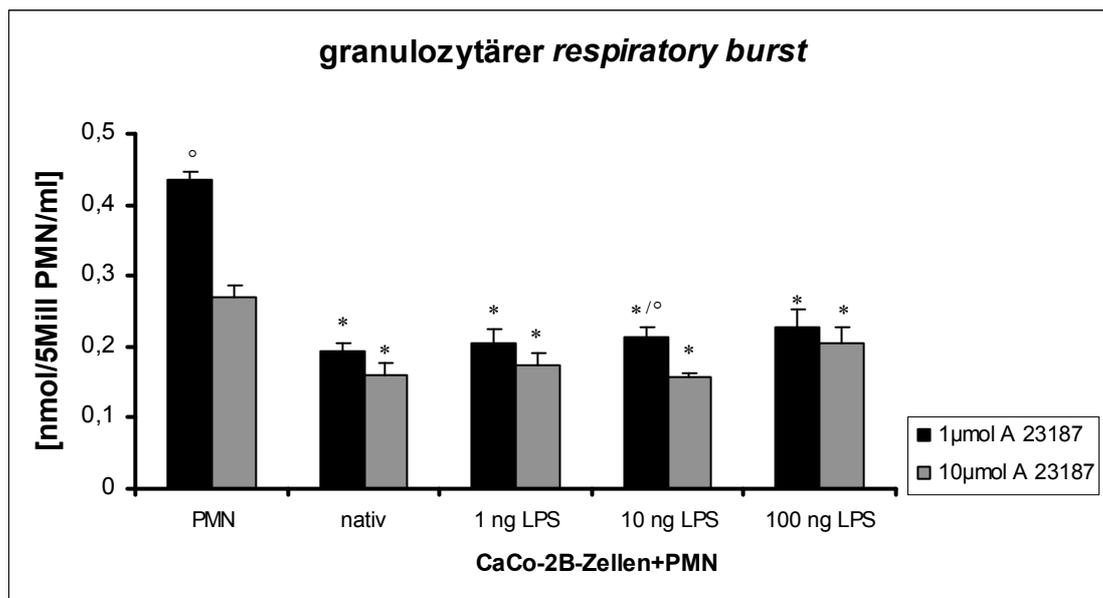
Erfolgte die Versuchsaktivierung mit 1 μ mol A 23187, war eine Zunahme der Elastasesekretion co-inkubierter PMN im Vergleich zu nicht co-inkubierten PMN nachweisbar (Grafik 8). Das statistische Signifikanzniveau ($p < 0,05$) wurde für die Subgruppen 10 ng/ml und 100 ng/ml LPS erreicht. Die weitere Zunahme der Elastasesekretion zwischen den Subgruppen 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml LPS war signifikant ($p < 0,05$).

Weiterhin zeigte sich eine signifikant höhere granulozytäre Elastasefreisetzung ($p < 0,05$) in allen Subgruppen nach Versuchsaktivierung mit 10 μ mol A 23187 im Vergleich zu 1 μ mol A 23187 (Grafik 8).

Für die Aktivierung des granulozytären *respiratory burst* fand sich in allen Versuchsansätzen mit LPS-vorbehandelten und nativen CaCo-2B-Zellen eine signifikante Suppression ($p < 0,05$) im Vergleich zu nicht co-inkubierten PMN (Grafik 9). Subgruppenanalysen erbrachten keinen signifikanten Einfluss der zur Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen eingesetzten LPS-Konzentrationen. Erfolgte die Stimulation mit 1 μ mol A 23187, wurde in den Subgruppen PMN und 10 ng/ml LPS-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen signifikant mehr granulozytäre Superoxid-Anionen freigesetzt, als nach Stimulation mit 10 μ mol A 23197 (Grafik 9).



Grafik 8: LPS-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen führen wie native CaCo-2B-Zellen zur signifikanten Suppression der granulozytären Elastasefreisetzung (*, $p < 0,05$) bei Stimulation mit 10 μmol A 23187. Der Anstieg der Elastasefreisetzung co-inkubierter PMN in Abhängigkeit zur steigenden LPS-Konzentration erreichte zwischen allen Untergruppen nicht das geforderte Signifikanzniveau. Erfolgte die Stimulation mit 1 μmol A 23187, zeigte sich eine Zunahme der Elastasefreisetzung co-inkubierter PMN, die in den Subgruppen 10 ng/ml und 100 ng/ml LPS statistisch signifikant war (\bullet , $p < 0,05$). Die weitere Zunahme der Elastasesekretion zwischen den Subgruppen 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml LPS war signifikant (Θ , $p < 0,05$). Die Applikation von 10 μmol A 23187 bewirkte eine signifikant höhere granulozytäre Elastasefreisetzung in allen Subgruppen ($^{\circ}$, $p < 0,05$) im Vergleich zu 1 μmol A 23187. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 8 Messungen.

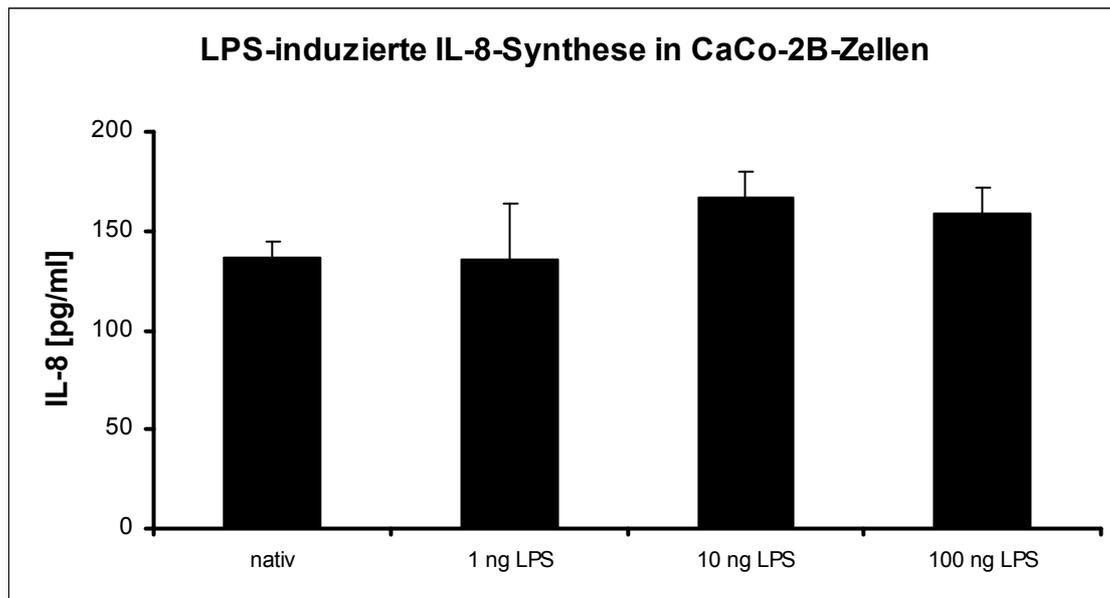


Grafik 9: LPS-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen bewirken wie native CaCo-2B-Zellen eine signifikante Reduktion der granulozytären Superoxidfreisetzung (*, $p < 0,05$) nach Stimulation mit 1 μmol und 10 μmol A 23187. Die eingesetzten LPS-Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die granulozytäre Superoxidfreisetzung. Erfolgte die Aktivierung mit 1 μmol A 23187, zeigte sich in den Subgruppen PMN und 10 ng/ml LPS eine signifikant höhere Superoxidsynthese der PMN ([°], $p < 0,05$), im Vergleich zur Stimulation mit 10 μmol A 23187. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus je 8 Messungen.

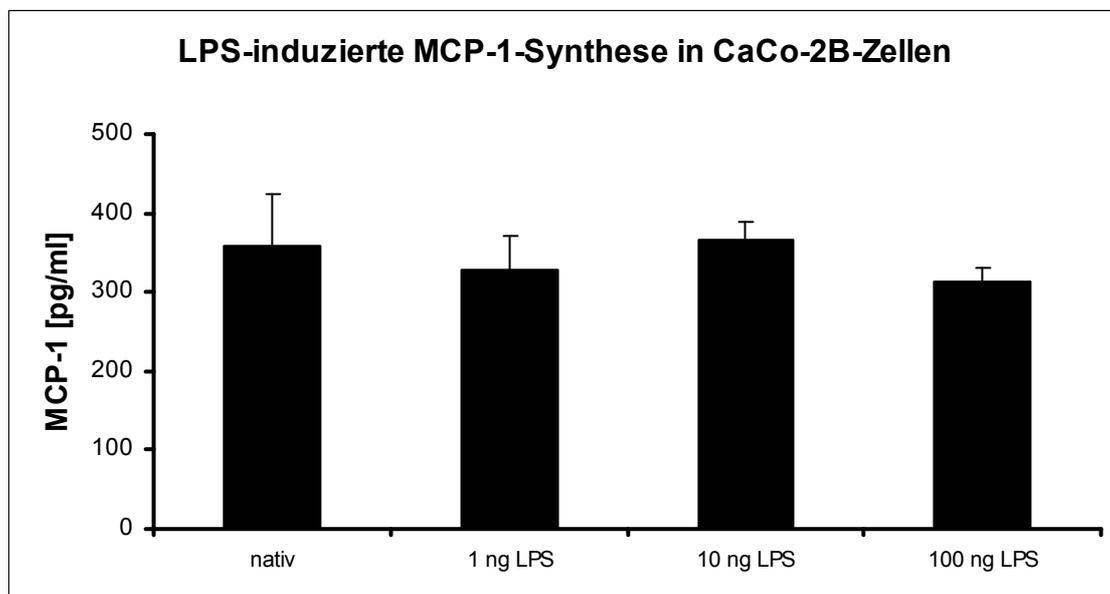
3.7. Einfluss von LPS auf die Synthese von MCP-1 und IL-8 in CaCo-2B-Zellen

Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit LPS hatte keine induktive Wirkung auf die IL-8- und MCP-1-Synthese in diesen Zellen.

Die 24-stündige Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit LPS führte zu keiner signifikanten Änderung der Syntheserate von IL-8 und MCP-1 in den CaCo-2B-Zellen ($p > 0,05$) (Grafik 10 und 11). Ein statistisch signifikanter Einfluss der zur Vorbehandlung eingesetzten LPS-Konzentrationen (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) auf die IL-8- und MCP-1-Synthese der CaCo-2B-Zellen war nicht nachweisbar.



Grafik 10: Die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit LPS in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml führte zu keiner signifikanten Zunahme der IL-8-Synthese ($p > 0,05$). Die Steigerung LPS-Konzentration im Versuchsansatz hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die synthetisierte IL-8-Menge der CaCo-2B-Zellen ($p > 0,05$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 5 Messungen pro Versuchsansatz.

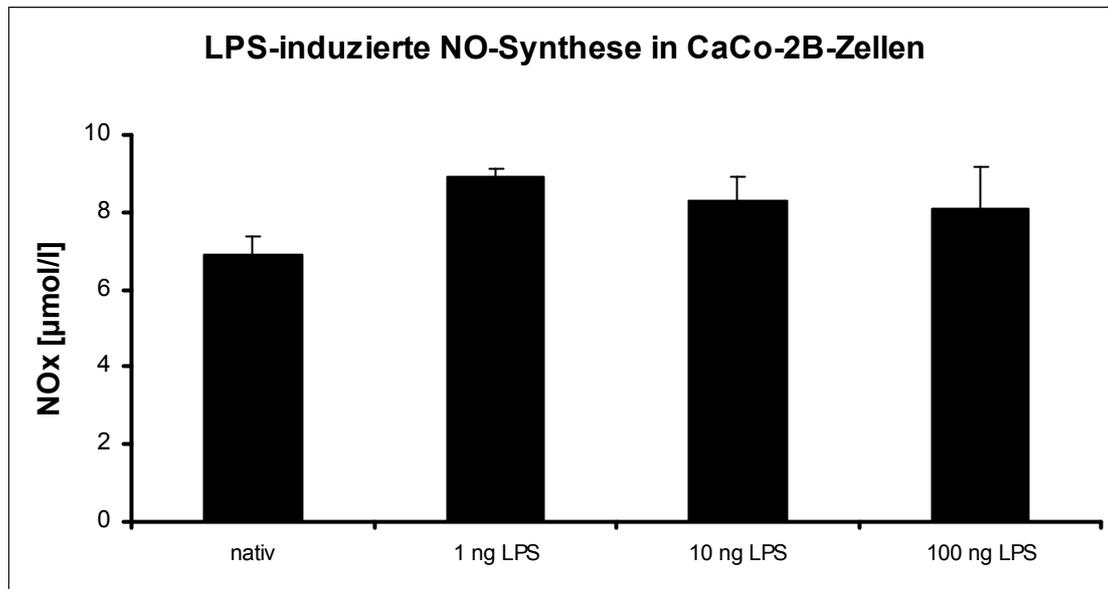


Grafik 11: Die Stimulation der CaCo-2B-Zellen mit LPS in den Konzentrationen von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml führte zu keiner signifikanten Induktion der MCP-1-Synthese ($p > 0,05$). Ein statistisch signifikanter Einfluss der zur Vorbehandlung eingesetzten LPS-Konzentration auf die MCP-1-Bildung der CaCo-2B-Zellen war nicht nachweisbar ($p > 0,05$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 5 Messungen pro Stimulationsansatz.

3.8. Untersuchung zum Einfluss von LPS auf die NO-Synthese in CaCo-2B-Zellen

Die Vorbehandlung von CaCo-2B-Zellen mit LPS zeigte keinen signifikanten Effekt auf deren NO-Synthese.

Die 24-stündige Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit LPS in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml induzierte jeweils eine geringfügige Steigerung der NO-Synthese im Vergleich zur NO-Synthese nicht vorbehandelter CaCo-2B-Zellen (Grafik 12). Das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde nicht erreicht. Die zur Vorbehandlung eingesetzte LPS-Konzentration hatte keinen signifikanten Einfluss auf die im Zellüberstand nachgewiesene NO_x-Konzentration.



Grafik 12: Die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit LPS in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml führte zu einem nicht signifikanten Anstieg der NO-Synthese ($p > 0,05$) der CaCo-2B-Zellen. Ein signifikanter Einfluss der zur Vorbehandlung eingesetzten LPS-Konzentration auf NO-Synthese der CaCo-2B-Zellen fand sich nicht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 6 Messungen pro Stimulationsansatz.

3.9. Untersuchung zur Induzierbarkeit der ecNOS-Proteinsynthese in CaCo-2B-Zellen durch Inkubation mit $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IFN\gamma$ bzw. mit LPS

Weder die Zytokine $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $IFN\gamma$ noch LPS führen in CaCo-2B-Zellen zu einer gesteigerten Expression des ecNOS-Proteins.

Die Zellen wurden 24 Stunden mit $TNF\alpha$ und LPS in den o.g. Konzentrationen sowie den beiden Zytokinmischen inkubiert. In keinem der experimentellen Ansätze konnte im Zellüberstand vorbehandelter CaCo-2B-Zellen eine signifikante Zunahme ($p > 0,05$) der ecNOS-Proteinkonzentration im Vergleich zu nativen CaCo-2B-Zellen nachgewiesen werden (keine Abbildung). Für jeden Stimulationsansatz wurden 5 Messungen durchgeführt.

3.10. Untersuchungen zum Einfluss nativer und Zytokin-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen auf den granulozytären 5-Lipoxygenase-Metabolismus

Die Inkubation von Granulozyten mit nativen oder $TNF\alpha$ -vorbehandelten CaCo-2B-Zellen hatte einen supprimierenden Effekt auf den granulozytären 5-Lipoxygenase-Metabolismus.

Dominierendes Reaktionsprodukt war LTB_4 (Grafik 14 und 16) mit seinen Abbauprodukten 20-OH- LTB_4 (Grafik 13 und 15) und 20-COOH- LTB_4 (nicht dargestellt). In geringeren Mengen waren auch die nicht enzymatisch entstandenen Zerfallsprodukte des LTA_4 (Diastereomere des 6-trans- LTB_4 und des 5,6-diHETE) sowie auch 5-HETE (nicht dargestellt) nachweisbar.

Erfolgte die Stimulation mit 1 μmol A 23187, fand sich für PMN die mit nativen und $TNF\alpha$ -vorbehandelten CaCo-2B-Zellen co-inkubiert waren eine signifikante Reduktion des nachgewiesenen OH- LTB_4 ($p < 0,05$) (Grafik 13). Eine Steigerung der $TNF\alpha$ -Konzentration im Versuchsansatz auf 10 ng/ml führte zu einer weiteren, signifikanten Verringerung des nachgewiesenen OH- LTB_4 ($p < 0,05$). Im Versuchsarm mit 10 μmol A 23187 zeigte sich ebenfalls eine Verminderung der granulozytären OH- LTB_4 -Synthese, wobei nur für die Subgruppen der $TNF\alpha$ -vorbehandelten CaCo-2B-Zellen geforderte Signifikanzniveau ($p < 0,05$) erzielt wurde (Grafik 13).

Bezüglich der granulozytären LTB₄-Synthese zeigte sich, dass TNF α -vorbehandelte CaCo-2B-Zellen wie native CaCo-2B-Zellen eine signifikante Suppression ($p < 0,05$) nach Stimulation mit 10 μmol A 23187 induzieren. Im Versuchsarm mit 1 μmol A 23187 zur Versuchsaktivierung wurde das geforderter Signifikanzniveau ($p < 0,05$) nur in den Subgruppen TNF α -vorbehandelte CaCo-2B-Zellen erreicht (Grafik 14).

Erfolgte die Aktivierung mit 10 μmol A 23187, zeigte sich außer in der Subgruppe 1 ng/ml TNF α eine signifikant höhere LTB₄-Synthese ($p < 0,05$) der PMN im Vergleich zur Stimulation 1 μmol A 23187 (Grafik 14).

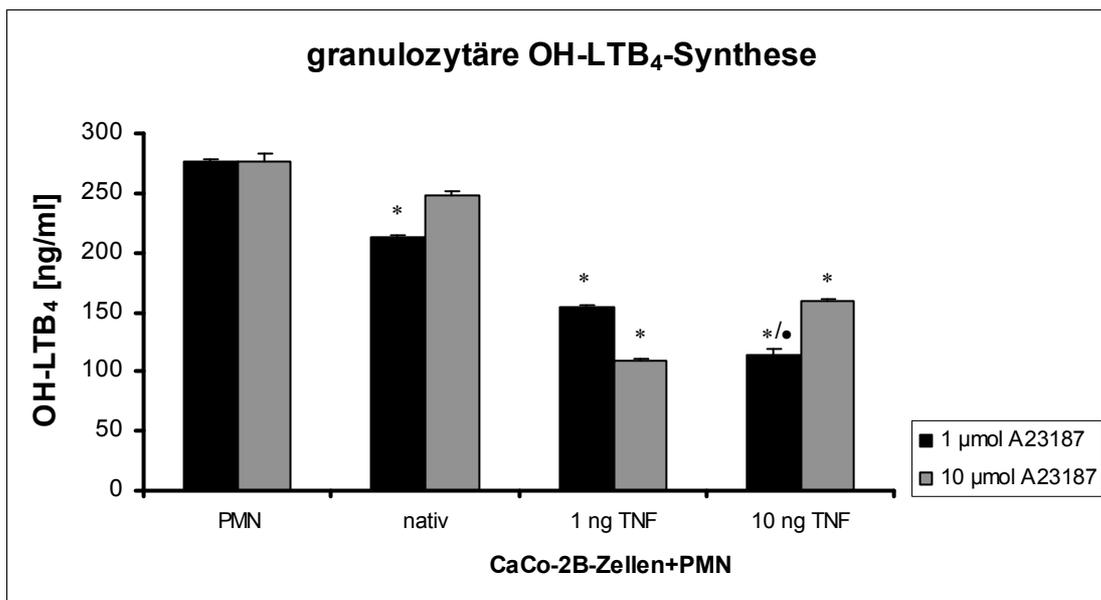
Zytokinmix-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen haben einen supprimierenden Einfluss auf die granulozytäre Leukotriensynthese.

Für die OH-LTB₄-Synthese wurde in der Versuchsreihe mit 10 μmol A 23187 zur Zellaktivierung das Signifikanzniveau nur in der Subgruppe PMN/Zytokinmix-high-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen erzielt. Wurden die Versuche mit 1 μmol A 23187 stimuliert, war eine signifikante Verringerung der OH-LTB₄-Synthese co-inkubierter (nativer und Zytomix-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen) PMN im Vergleich zu nativen PMN nachweisbar ($p < 0,05$) (Grafik 15).

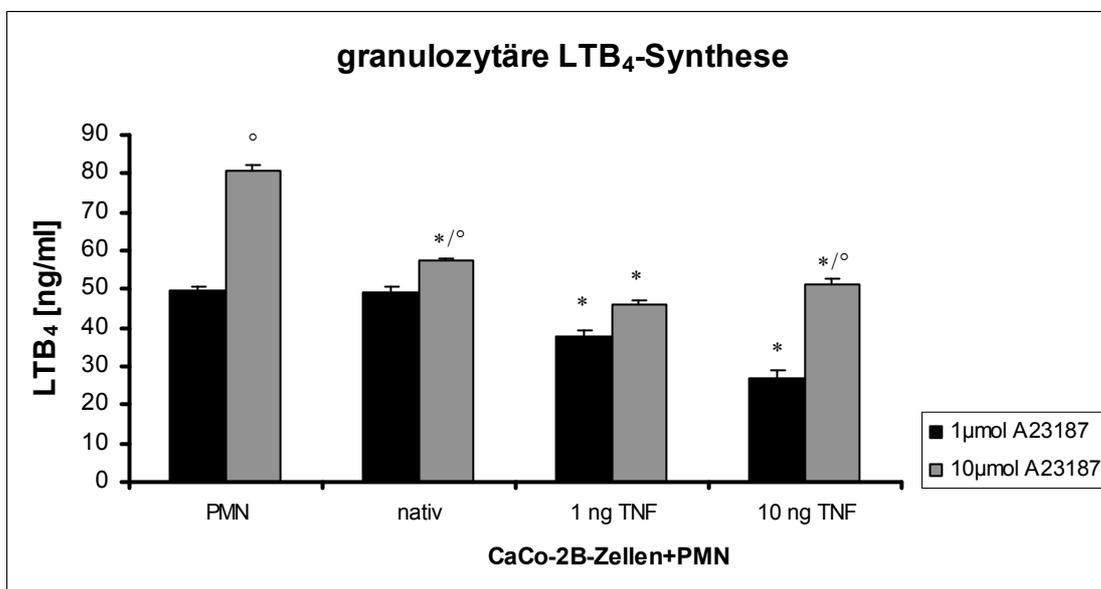
In Bezug auf die granulozytäre LTB₄-Synthese zeigte sich ein vergleichbares Bild (Grafik 16). Erfolgte die Aktivierung der Versuche mit 10 μmol A 23187, war eine signifikante Abnahme der LTB₄-Synthese co-inkubierter PMN im Vergleich zu nativen PMN nachweisbar ($p < 0,05$). Wurden die Experimente mit 1 μmol A 23187 durchgeführt, wurde das Signifikanzniveau nur für den Subgruppenvergleich PMN nativ versus PMN/Zytokinmix-high-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen erreicht (Grafik 16).

Erfolgte die Aktivierung mit 10 μmol A 23187, zeigte sich außer in der Subgruppe Zytokinmix-high eine signifikant höhere LTB₄-Synthese ($p < 0,05$) der PMN im Vergleich zur Stimulation 1 μmol A 23187 (Grafik 16).

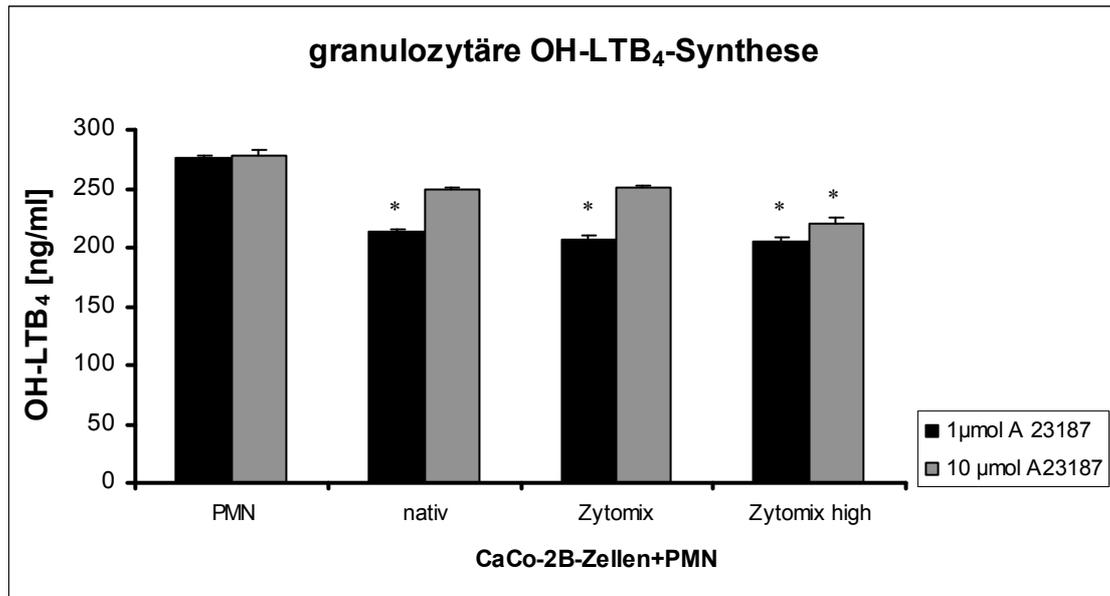
Die von nativen und auch vorbehandelten CaCo-2B-Zellen synthetisierten Leukotriene waren vernachlässigbar gering (nicht dargestellt), sodass die nachgewiesenen Leukotriene nahezu ausschließlich granulozytären Ursprungs sind.



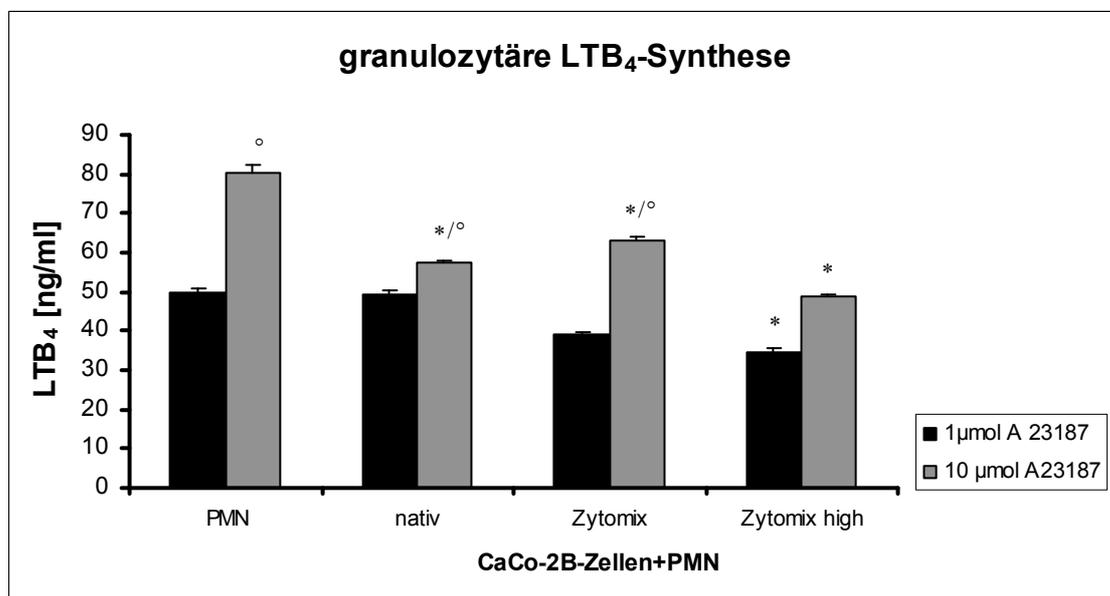
Grafik 13: Die Inkubation von PMN mit nativen und TNF α -vorbehandelten CaCo-2B-Zellen induzierte eine Suppression der granulozytären OH-LTB₄-Synthese (*, $p < 0,05$). Im Versuchsarm mit 10 μmol A 23187 wurde nur für die Subgruppen 1 ng/ml TNF α und 10 ng/ml TNF α das Signifikanzniveau (*, $p < 0,05$) erreicht. Eine Steigerung der TNF α -Konzentration im Versuchsansatz auf 10 ng/ml bewirkte nach Hinzugabe von 1 μmol A 23187 eine weitere, signifikante Verringerung des synthetisierten OH-LTB₄ (•, $p < 0,05$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 5 Messungen.



Grafik 14: TNF α -vorbehandelte CaCo-2B-Zellen bewirken wie native CaCo-2B-Zellen eine Suppression der granulozytären LTB₄-Synthese (*, $p < 0,05$) nach Stimulation mit 1 μmol und 10 μmol A 23187. Im Versuchsarm mit Stimulation mit 1 μmol A 23187 wurde das geforderte Signifikanzniveau nur für die Subgruppen TNF α -vorbehandelte CaCo-2B-Zellen erzielt (*, $p < 0,05$). Erfolgte die Aktivierung mit 10 μmol A 23187, zeigte sich außer in der Subgruppe 1 ng/ml TNF α eine signifikant höhere LTB₄-Synthese (°, $p < 0,05$) der PMN im Vergleich zur Stimulation 1 μmol A 23187. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 5 Messungen, Subgruppe 10 ng/ml TNF α /1 μmol A 23187 3 Messungen.



Grafik 15: Zytokinmix-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen bewirken wie native CaCo-2B-Zellen eine signifikante Suppression der granulozytären OH-LTB₄-Synthese (*, $p < 0,05$) nach Stimulation mit 1 µmol A 23187. Im Versuchsarm mit 10 µmol A 23187 wurde nur für die Subgruppe Zytokinmix-high-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen das Signifikanzniveau (*, $p < 0,05$) erreicht. Ein signifikanter Einfluss der zur Stimulation eingesetzten Zytokinkonzentration bzw. A 23187-Konzentration auf die granulozytäre OH-LTB₄-Synthese fand sich nicht. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus jeweils 5 Messungen.



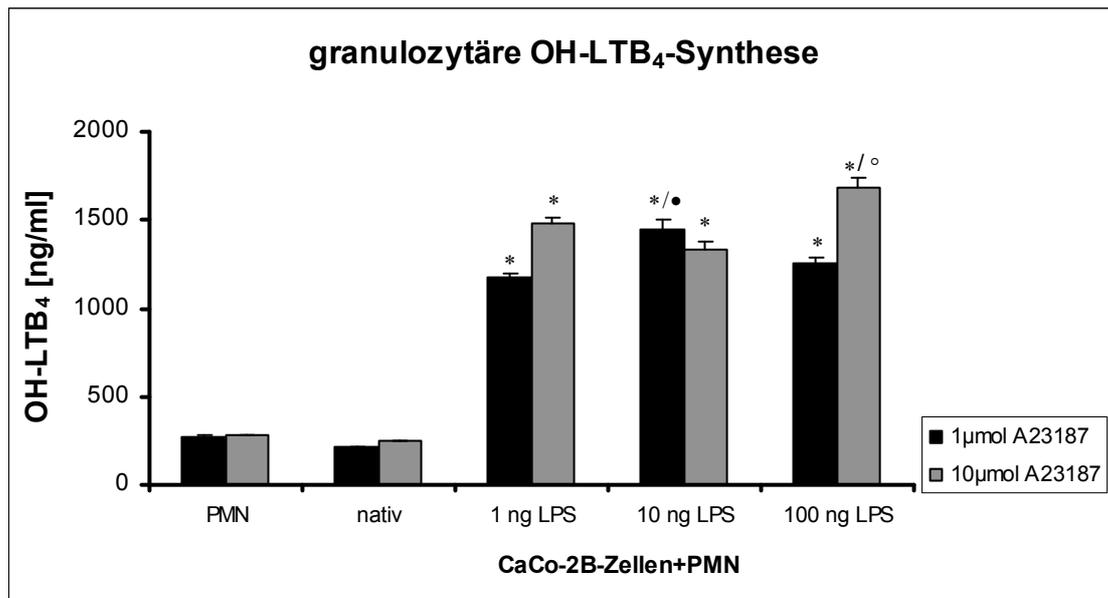
Grafik 16: Zytokinmix-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen bewirken wie native CaCo-2B-Zellen eine Suppression der granulozytären LTB₄-Synthese (*, $p < 0,05$) nach Hinzugabe vom 10 µmol A 23187. Im Versuchsarm mit 1 µmol A 23187 zur Stimulation wurde das Signifikanzniveau nur für die Subgruppe Zytokinmix-high-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen erreicht (*, $p < 0,05$). Erfolgte die Aktivierung mit 10 µmol A 23187, zeigte sich außer in der Subgruppe Zytokinmix-high eine signifikant höhere LTB₄-Synthese (°, $p < 0,05$) der PMN im Vergleich zur Stimulation 1 µmol A 23187. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus jeweils 5 Messungen pro Stimulationsansatz.

3.11. Untersuchungen zum Einfluss LPS-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen auf die granulozytäre Leukotriensynthese

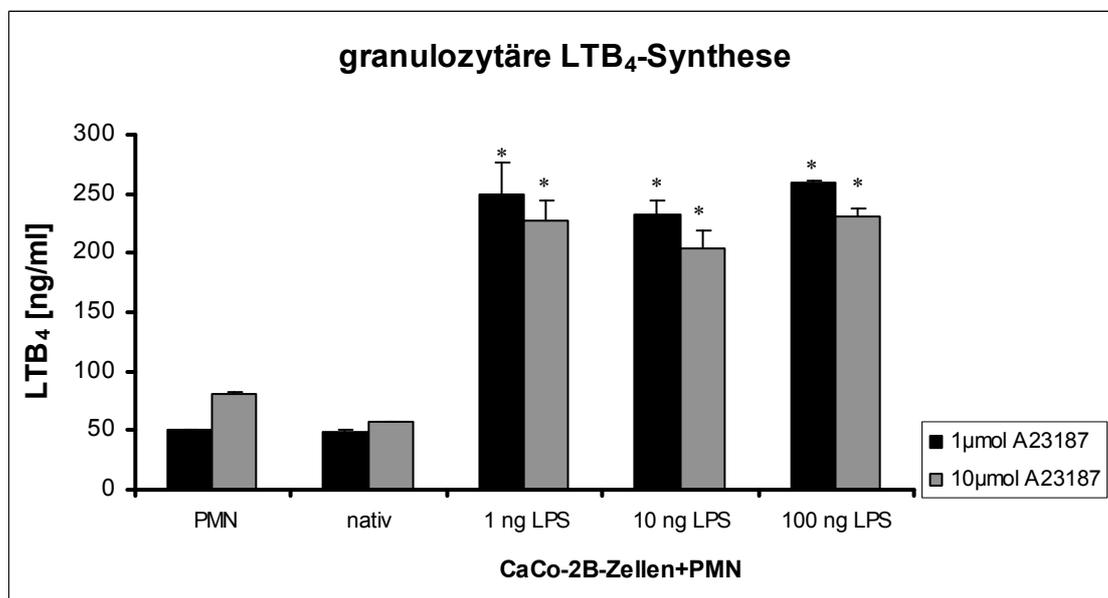
Die Co-Inkubation von PMN mit LPS-vorbehandelten CaCo-2B-Zellen induzierte eine massive Amplifizierung der granulozytären Leukotriensynthese.

Es zeigte sich, dass es unter diesen Versuchsbedingungen zu einer massiven Aktivierung des granulozytären 5-Lipoxygenase-Metabolismus kam. Die im Zellüberstand nachweisbaren Leukotriene OH-LTB₄ und LTB₄ lagen jeweils in einer ca. 5-fach höheren Konzentration im Vergleich zu den Ansätzen aus PMN bzw. PMN und nativen CaCo-2B-Zellen vor. Das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) wurde jeweils sicher erreicht (Grafik 17 und 18). In der Versuchsreihe mit 1 μmol A 23187 zeigte sich zudem eine signifikant höhere OH-LTB₄-Synthese der Granulozyten, die mit 10 ng/ml LPS-vorbehandelten CaCo-2B-Zellen inkubiert waren, im Vergleich zu den Ansätzen mit 1 ng/ml und 100 ng/ml LPS-vorbehandelten CaCo-2B-Zellen (Grafik 17). Wurden die Versuche mit 10 μmol A 23187 stimuliert, kam es zu einer signifikanten Steigerung der granulozytären OH-LTB₄-Synthese im Versuchsansatz mit 100 ng/ml LPS im Vergleich zu 10 ng/ml LPS (Grafik 17).

Eine signifikante Abhängigkeit der granulozytären LTB₄-Synthese von der zur Stimulation eingesetzten Konzentration des LPS bzw. des A 23187 fand sich nicht (Grafik 18).



Grafik 17: Die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit LPS führte bei Co-Inkubation mit PMN zur signifikanten Zunahme der granulozytären OH-LTB₄-Synthese (*, $p < 0,05$). In der Versuchsreihe mit 1 µmol A 23187 fand sich eine signifikant höhere granulozytäre OH-LTB₄-Synthese (•, $p < 0,05$) bei Co-Inkubation der PMN mit 10 ng/ml LPS-vorbehandelten CaCo-2B-Zellen im Vergleich zu 1 ng/ml und 100 ng/ml LPS. Eine signifikante Steigerung der OH-LTB₄-Synthese war im Versuchsansatz mit 100 ng/ml LPS im Vergleich zur 10 ng/ml LPS nach Hinzugabe von 10 µmol A 23187 nachzuweisen (°, $p < 0,05$). Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus 5 Messungen.



Grafik 18: Die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit LPS führt bei Co-Inkubation mit PMN zur signifikanten Zunahme der granulozytären LTB₄-Synthese (*, $p < 0,05$) nach Stimulation mit 1 µmol und 10 µmol A 23187. Eine signifikante Abhängigkeit der granulozytären LTB₄-Synthese von der zur Stimulation eingesetzten Konzentration des LPS bzw. des A 23187 fand sich nicht. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus jeweils 5 Messungen.

4. Diskussion

Die Oberfläche der gastrointestinalen Mukosa bildet mit 100 – 400 m² die größte Grenzschicht zwischen dem Wirtsorganismus und der Umwelt. Sie ist einer der wichtigsten Schauplätze in der Konfrontation des Wirtes mit mikrobiellen Organismen sowie apathogenen und pathogenen Stoffen aus der Nahrung und der Umwelt. Da die Inkorporation einiger dieser Substanzen für den Menschen mitunter deletäre Auswirkungen haben kann, verfügt die intestinale Mukosa über sehr effektive Mechanismen und verschiedenartige Elemente, um die Integrität des Wirtsorganismus gegenüber der Umwelt zu bewahren (171). Dies ist zum einen die dem intestinalen Epithel luminal vorgelagerte Schicht bestehend aus Mukus, sekretorischem IgA und Bicarbonat (171). Die intestinalen Epithelzellen besitzen des Weiteren ein komplexes pro- und antiinflammatorisch wirkendes Genprogramm (172). Charakteristisches Merkmal dieses Genprogrammes ist die Fähigkeit, nach Aktivierung frühzeitig eine effektive Entzündungsantwort zu generieren (173,174). Diese wird durch Zytokine, Chemokine, Leukotriene, Prostaglandine und auch durch NO vermittelt. Synthetisiert werden diese Substanzen von den ortsständigen Enterozyten aber auch von Endothelzellen, Makrophagen und den aktiv ins Entzündungsgebiet eingewanderten Granulozyten und Monozyten (3,24,27,69). Ein weiterer eminent wichtiger Bestandteil ist das Mukosa-assoziierte Immunsystem (3,4,22,171). Es unterscheidet unter physiologischen Bedingungen mit hoher Selektivität zwischen pathogenen und apathogenen Keimen (3,4,22,171). Pathogene Keime werden nach spezifischer Antikörperproduktion zügig eliminiert und systemische Immunreaktionen auf Nahrungsmittelallergene und Antigene der physiologischen Darmflora unterdrückt (22,171). Dies entspricht der physiologischen Hyporeagibilität des mukosalen Immunsystems.

Die gastrointestinale Barriere kann jederzeit durch verschiedene Mechanismen wie Infektionen, Zytostatika, Hypersensitivitätsreaktionen oder durch eine letztendlich inadäquate Aktivierung des Immunsystems bei idiopathischen oder autoimmunologischen Erkrankungen, wie M. Crohn und Colitis ulcerosa, kompromittiert werden (171). Es entsteht eine inflammatorische Situation, die zur Einwanderung und Aktivierung proinflammatorischer Zellen, wie z.B. Granulozyten und Monozyten, führt. Parallel dazu werden ortsständigen Zellen, wie Enterozyten und Endothelzellen, aktiviert (1-5,22,171). Als Folge dieses Prozesses können jetzt für den Wirt potenziell gefährliche luminale

Bestandteile, wie z.B. LPS, mit dem Epithel und dem subepithelialen Gewebe in Kontakt treten (1-5,171).

LPS ist ein sehr potenter proinflammatorischer Mediator, der die ortsständigen intestinalen Epithelzellen sowie die eingewanderten Entzündungszellen aktiviert und so die Freisetzung einer Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren fördert. Des Weiteren wird die Leukozytenmigration in das Entzündungsgebiet angeregt (175,176). Dies alles kann zu einer Perpetuierung des Entzündungsprozesses beitragen (1-5,13,22).

Die vorgelegten Untersuchungen adressieren die floriden inflammatorischen Reaktionen des Epithels. Intestinale Epithelzellen, hier CaCo-2B-Zellen, wurden initial mit proinflammatorischen Mediatoren und nachfolgend mit neutrophilen Granulozyten inkubiert. Die Aktivierung beider Zellarten erfolgte mit dem Ca^{2+} -Ionophor A 23187. Ziel war es, die Wirkung der Mediatoren auf bestimmte zelluläre Syntheseprozesse der CaCo-2B-Zellen (NO, IL-8, MCP-1, Leukotriene) sowie auf die Kooperation beider Zellarten miteinander zu untersuchen.

4.1. Synthese proinflammatorischer Mediatoren in CaCo-2B-Zellen

Die im Rahmen der Experimente eingesetzten CaCo-2B-Zellen sind hinsichtlich ihrer Fähigkeit Entzündungsmediatoren, Adhäsionsmoleküle und Oberflächenrezeptoren zu synthetisieren gut charakterisiert (150-159).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Vorbehandlung der CaCo-2-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ und LPS keinen signifikanten Einfluss auf die Synthese von IL-8 und MCP-1 der CaCo-2B-Zellen hatte. Die Stimulation der CaCo-2B-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ führte jedoch zu einer signifikanten Zunahme der NO-Synthese, während LPS diesbezüglich keinen Einfluss erkennen lies. Wurden die CaCo-2B-Zellen mit dem Zytokingemisch, bestehend aus $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β und $\text{INF}\gamma$ inkubiert, hatte dies eine Steigerung der Synthese von IL-8, MCP-1 und von NO zur Folge. Aktuell ist die Datenlage bezüglich der induktiven Wirkung einzelner Entzündungsmediatoren auf die Synthese pro- und antiinflammatorischer Mediatoren in CaCo-2B-Zellen relativ spärlich. Es finden sich Daten, die eine Steigerung der IL-8 und MCP-1-Synthese in CaCo-2B-Zellen nach Vorbehandlung mit IL-1 β belegen (177). Dagegen scheint $\text{INF}\gamma$ keinen Einfluss auf die α - und β -Chemokin-Synthese zu haben (178). Es wurde jedoch gezeigt, dass $\text{INF}\gamma$ in CaCo-2B-Zellen zu einer Steigerung der NO-Synthese führt, und diese wahrscheinlich über die

Induktion der iNOS vermittelt wird (179). Für LPS findet sich lediglich die Beschreibung, dass es keinen stimulierenden Effekt auf die IL-8-Synthese hat (177). Bezüglich des Effekts von LPS auf die NO-Synthese in CaCo-2B-Zellen liegen keine Daten vor.

Native CaCo-2B-Zellen sind in der Lage, die destruktiven granulozytären Zellreaktionen abzuschwächen, wenn sowohl PMN als auch die CaCo-2B-Zellen aktiviert werden. Dieser hemmende Einfluss tritt nicht auf, wenn nur die PMN in Gegenwart der CaCo-2B-Zellen stimuliert werden (160). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der supprimierende Einfluss der CaCo-2B-Zellen nach Vorbehandlung mit proinflammatorischen Mediatoren weiterhin vorhanden ist. Voraussetzung ist allerdings, dass sowohl die PMN als die CaCo-2B-Zellen mittels des Ca^{2+} -Ionophor A 23187 aktiviert werden. In Kenntnis vorhergehender Resultate (160) können wir die These formulieren, dass die hemmende Wirkung Zytokin- und LPS-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen auf die granulozytäre Sauerstoffradikalsynthese und Elastasefreisetzung sehr wahrscheinlich NO-vermittelt ist.

4.2. Modulation der granulozytären Sauerstoffradikalfreisetzung durch NO

NO wird mittels des Enzyms NO-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert (97). In Säugetierzellen differenziert man derzeit zwei konstitutive (cNOS: ncNOS, ecNOS) und eine induzierbare NO-Synthase (iNOS) (98-100). Da die ncNOS ausschließlich im Nerven- und Skelettmuskelgewebe vorkommt, liegt die Vermutung nahe, dass die ecNOS die konstitutive NO-Synthase in den CaCo-2B-Zellen ist. Gestützt wird diese Vermutung durch den positiven ecNOS-Proteinnachweis im Rahmen unserer Experimente. Die genetische Information zur Synthese der iNOS findet dagegen in allen Körperzellen, so wahrscheinlich auch in CaCo-2B-Zellen, obwohl es darüber keine speziellen Daten gibt (98-100).

Das in relativ kleiner Menge durch die cNOS synthetisierte NO erfüllt fast ausschliesslich Aufgaben im Rahmen physiologischer Prozesse (10,90,113,114). Dagegen spielt das in großen Mengen durch die iNOS synthetisierte NO im Rahmen akuter und chronischer inflammatorischer Reaktionen als potenter proinflammatorischer Mediator eine wichtige Rolle. Dabei wirkt das NO zum einen über seine molekularen Angriffspunkte zum anderen auch über Peroxynitrit, das durch die Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies entsteht, zytotoxisch (Tabelle 1,107,108).

Aktiviert neutrophile Granulozyten synthetisieren NADPH-abhängig reaktive Sauerstoffspezies, die direkt zytotoxisch wirken. Weiterhin induzieren diese Sauerstoffradikale die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothel- und Epitheloberflächen, als unmittelbare Voraussetzung für die Initiierung und Erhaltung einer akuten und chronischen Entzündungsreaktion (28,114).

In der Literatur bislang zwei unterschiedliche Wege beschrieben, wie NO in den granulozytären Superoxid-Metabolismus modulierend eingreifen kann. Für NO wurde zum einen nachgewiesen, dass es die granulozytäre Superoxid-Anion-Bildung durch Hemmung der granulozytären NADPH-Oxidase vermindert. NO reagiert dabei direkt mit der Membrankomponente des Enzyms (180,181). In der vorliegenden Literatur wird aber nicht zwischen dem von der cNOS- bzw. der iNOS-synthetisierten NO unterschieden (180). Des Weiteren reagiert NO mit den granulozytären Sauerstoffradikalen zu dem sehr instabilen Peroxynitrit, das schnell zu dem chemisch inerten Nitrat und Nitrit abgebaut wird. Auf diese Weise kann die Akkumulation des toxischen Hydrogenperoxids und Hydrogenradikals vermindert werden (90,180,182). Peroxynitrit selbst ist zytotoxisch. Aufgrund seiner chemischen Instabilität könnte man jedoch annehmen, dass ein relevanter gewebedestruierender Effekt erst bei hohen Konzentrationen bzw. bei länger bestehenden oder chronischen inflammatorischen Prozessen zur Geltung kommt (107,108).

4.3. Hypothesen zur NO-vermittelten Suppression der destruktiven granulozytären Reaktionen

Bestimmt wurde die NO-Synthese in nativen im Vergleich zu proinflammatorisch vorbehandelten CaCo-2B-Zellen ohne Hinzugabe des Ca^{2+} -Ionophor A 23187. Aus diesem Grund kann man vermuten, dass die Aktivität der cNOS, respektive ecNOS, in den nativen CaCo-2B-Zellen der Basisaktivität/Grundaktivität des Enzyms entsprechen dürfte. Messbares Korrelat wäre dann die im Zellüberstand nativer CaCo-2B-Zellen nachweisbare NO_x-Konzentration. Ob eine zusätzliche Basisaktivität der iNOS besteht, ist durchaus vorstellbar, entsprechende Daten liegen jedoch nicht vor. Eine Induktion der ecNOS-Proteinsynthese durch die eingesetzten proinflammatorischen Mediatoren konnte nicht nachgewiesen werden, sodass unter diesen Bedingungen die Zunahme der NO_x-Konzentration im Zellüberstand sehr wahrscheinlich durch Induktion und Aktivierung der iNOS hervorgerufen wurde.

Ferner erlauben die Daten die Hypothese, dass auch nach Hinzugabe von A 23187 im Rahmen der Experimente weiterhin die von der cNOS synthetisierte NO-Menge nativer CaCo-2B-Zellen der vorbehandelter CaCo-2B-Zellen entsprechen dürfte.

Die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit LPS hatte eine nicht signifikante Steigerung der NO-Synthese im Vergleich zu nativen CaCo-2B-Zellen zur Folge. Eine moderate Aktivierung der iNOS durch LPS ist aufgrund dessen wahrscheinlich. Die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit TNF α führte zu einer signifikanten Steigerung der NO-Synthese, sodass auch hier die Induktion der iNOS in den vorbehandelten CaCo-2B-Zellen postuliert werden kann. Das durch die CaCo-2B-Zellen synthetisierte NO könnte durch Hemmung der NADPH-Oxidase der co-inkubierten PMN die Sauerstoffradikalbildung direkt inhibieren. Alternativ dazu wäre die Reaktion von NO mit den freigesetzten granulozytären Sauerstoffradikalen zum instabilen Peroxynitrit sowie dessen rascher Zerfall zu Nitrat/Nitrit möglich.

Wurden die CaCo-2B-Zellen mit dem Zytokinmixin vorbehandelt, kam es zur signifikanten Zunahme der NO-Synthese, die wahrscheinlich durch Induktion der iNOS bedingt ist. Die Suppression der nachweisbaren granulozytären Sauerstoffradikale dürfte auch hier über die zwei bekannten Mechanismen erfolgt sein. Gleichzeitig fand sich unter diesen Versuchsbedingungen eine signifikante Zunahme der IL-8 und MCP-1-Synthese der CaCo-2B-Zellen. Die Granulozyten waren in diesem Versuchsansatz neben A 23187 zusätzlich sehr potenten Aktivatoren ausgesetzt (35-37). Unter diesen Bedingungen wäre somit eine messbare Steigerung der granulozytären Sauerstoffradikalbildung und Elastasefreisetzung prinzipiell denkbar. Dieser gesteigerten Sauerstoffradikalbildung stünde aber gleichzeitig eine deutlich erhöhte NO-Menge zur Inaktivierung gegenüber, sodass auch unter diesen Bedingungen das nachgewiesene Ergebnis mit Reduktion der granulozytären Sauerstoffradikale möglich ist.

Für alle drei Versuchsreihen muss angemerkt werden, dass der dominierende Weg zur Verminderung der nachgewiesenen granulozytären Sauerstoffradikale bei Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit CaCo-2B-Zellen und Aktivierung mit A 23187 aus den vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden kann. Es ist jedoch zu vermuten, dass diese Mechanismen parallel nebeneinander ablaufen, da das von den CaCo-2B-Zellen synthetisierte NO sowohl mit von Granulozyten synthetisierten Sauerstoffradikalen als auch mit der NADPH-Oxidase in der Zellmembran der PMN in Kontakt kommt. Der Anteil jedes einzelnen Mechanismus am Gesamtergebnis kann jedoch nicht angegeben werden.

Welche Rolle unter den Bedingungen der iNOS-Aktivierung die durch A 23187 aktivierte cNOS der CaCo-2B-Zellen spielt, ist bislang nicht vollständig geklärt. In Untersuchungen zur Pathogenese der Sepsis konnte u.a. gezeigt werden, dass eine Hemmung der cNOS durch unselektive NO-Inhibitoren die Prognose der Patienten deutlich verschlechtert (183). Vergleichbare Ergebnisse lieferten Untersuchungen zur Pathogenese von CED und rheumatischen Erkrankungen (98,109). Deswegen liegt es nahe anzunehmen, dass das durch die cNOS synthetisierte NO auch unter stark inflammatorischen Bedingungen, in Gegenwart von zum Teil sehr hohen NO-Konzentrationen, weiterhin regulatorische antiinflammatorische und homöostatische Funktionen erfüllt, um so die Integrität des Organismus aufrechtzuerhalten. In welchem Ausmaß diese antiinflammatorischen Funktionen an der Reduktion der nachweisbaren granulozytären Superoxide beteiligt sind, ist derzeit noch unbekannt.

Prinzipiell sind auch andere Wege zur Inaktivierung der granulozytären Superoxid-Anionen möglich. Unter anderem ist in CaCo-2B-Zellen das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) nachgewiesen worden (159). Inwieweit dieses Enzym an der Inaktivierung der Superoxid-Anionen mitwirkt und ob noch andere Reaktionswege ablaufen, ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Ebenso sind in der vorliegenden Literatur keine weiteren möglichen Wege beschrieben, wie NO die granulozytäre Elastasefreisetzung supprimieren bzw. die Elastaseinaktivierung vermitteln könnte. Mehrere Arbeiten zeigten, dass CaCo-2B-Zellen über die sekretorische Form des Leukozyten-Proteinase-Inhibitors (SLPI) verfügen, einem der wichtigsten Inhibitoren von Serin-Proteasen wie der granulozytären Elastase (158). Eine Modulation der Aktivität des Leukozyten-Proteinase-Inhibitors und auch der Superoxid-Dismutase, eventuell durch das von der cNOS synthetisierte NO, ist eine weitere Möglichkeit für den beobachteten Effekt.

4.4. Phospholipasen A_2 - zentrale Enzyme der Eicosanoidsynthese

Neutrophile Granulozyten besitzen die Enzyme für die Leukotriensynthese sowie eine Phospholipase zur Freisetzung der Ausgangssubstanz Arachidonsäure (AA) (73,74). Die Aktivität dieser Enzyme ist an einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration gekoppelt, sodass nach Stimulation der PMN mit dem Ca^{2+} -Ionophor A 23187 deren Leukotriensynthese initiiert wird (73,74). Für CaCo-2B-Zellen ist nachgewiesen worden, dass sie in sehr geringem Umfang zur Leukotriensynthese nach Aktivierung mit A 23187

befähigt sind (184,185). In unseren Versuchen war die von nativen und vorbehandelten CaCo-2B-Zellen synthetisierte Leukotrienmenge vernachlässigbar gering, sodass die detektierten Leukotriene (LTB_4 , OH-LTB_4) nahezu ausschließlich granulozytären Ursprungs waren. Die Inkubation der PMN mit nativen und mit $\text{TNF}\alpha$ - bzw. Zytokinmix-vorbehandelten CaCo-2B-Zellen zeigte einen vornehmlich supprimierenden Effekt auf die granulozytäre Leukotriensynthese nach Aktivierung mit A 23187. Wurden hingegen LPS-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen mit PMN inkubiert und dann mit A 23187 stimuliert, fand sich eine massive Zunahme der nachgewiesenen Leukotriene im Zellüberstand.

Die Freisetzung der AA aus den Membranphospholipiden ist der initiale und gleichzeitig auch geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthese potenter proinflammatorischer Phospholipidmediatoren wie Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxan A_2 (70,186,187). Die Phospholipasen A_2 (PLA_2) sind die dafür erforderlichen Enzyme. Sie kommen in zahlreichen Säugetier- und Nicht-Säugetierzellen vor. Sie setzen sehr spezifisch Fettsäuren, v.a. Arachidonsäure, aus der sn-2-Position der Membranphospholipide frei (186,187). In Kenntnis dieser Fakten kann man die Mutmaßung anstellen, dass LPS-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen die Arachidonsäure als Ausgangssubstanz für die granulozytäre Leukotriensynthese in großer Menge aus ihren Membranphospholipiden freisetzen. Voraussetzung hierfür wäre die Aktivierung einer Phospholipase A_2 in den CaCo-2B-Zellen durch LPS. Dieses Prinzip der kooperativen Eicosanoidsynthese konnte schon zwischen Granulozyten und Alveolarmakrophagen und zwischen Granulozyten und Chondrozyten nachgewiesen werden (71,72).

Die Enzymfamilie der PLA_2 wird aktuell in fünf Hauptklassen eingeteilt (186,187):

1. sekretorische Form mit einem niedrigen Molekulargewicht (1-4 kD) = sPLA_2
 - pankreatische Form für die Phospholipidspaltung der Nahrung = $\text{sPLA}_2\text{-I}$
 - nicht-pankreatische Form = $\text{sPLA}_2\text{-II}$
2. zytosolische Form mit einem hohen Molekulargewicht (60-110 kD) = cPLA_2
3. calciumunabhängige Form = $\text{cPLA}_2\text{-}\gamma$
4. PAF-Acetyl-Hydrolase
5. Lysosomale PLA_2

Die zytosolische und die sekretorische Form der Phospholipase A_2 unterscheiden sich in einer Reihe von Aspekten (186-188). Die cPLA_2 ist im Zytosol einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, inflammatorisch aktive Zellen und normale Körperzellen, lokalisiert. Im Rahmen der Zellaktivierung kommt es calciumabhängig zur Translokation der cPLA_2 an die Zellkernmembran mit nachfolgender Enzymaktivierung (70,74,186,188).

Der überwiegende Teil der freigesetzten Arachidonsäure wird wahrscheinlich intrazellulär verstoffwechselt. Die sPLA₂ wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine und LPS in den Extrazellularraum sezerniert (186,189,190). Hier befindet sie sich in einer Umgebung mit mikromolarer Calciumkonzentration, die zur Bindung der sPLA₂ an spezifische Oberflächenrezeptoren und zur Enzymaktivierung ausreichend ist (186,187). Nachfolgend steigt die Konzentration von AA im Extrazellularraum an. Die calciumunabhängige Phospholipase A₂, cPLA₂-γ, ist bislang nur in humanen Herz- und Skelettmuskelzellen nachgewiesen worden (191). Die PAF-Acetyl-Hydrolase ist in den PAF-Metabolismus involviert, die lysosomale PLA₂ fand sich bisher nur in einer murinen Zellart (187).

Die präzise Funktion der cPLA₂ und sPLA₂, insbesondere der Anteil beider Enzyme an der Eicosanoidsynthese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen, ist bislang noch nicht eindeutig identifiziert.

Für CaCo-2B-Zellen ist bisher nur nachgewiesen worden, dass sie zur Leukotriensynthese befähigt sind (184,185). Durch welchen Subtyp der Phospholipasen A₂ die notwendige Arachidonsäurefreisetzung erfolgt, und ob CaCo-2B-Zellen wie intestinale Epithelzellen auch über beide Subtypen der Phospholipasen A₂ (cPLA₂ und sPLA₂) verfügen, ist bislang nicht geklärt (187). Ebenso wenig gibt es in der Literatur Daten darüber, ob CaCo-2B-Zellen auf den 5-Lipoxygenase-Metabolismus co-inkubierter Zellen modulierend einwirken und wenn ja, wie sich die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen oder mit LPS darauf auswirkt.

4.5. Kooperative Eicosanoidsynthese - hypothetischer Mechanismus der LPS-induzierten Amplifizierung der granulozytären Leukotriensynthese

Prinzipiell könnte LPS die in den CaCo-2B-Zellen vorhandene Phospholipase A₂ unter Nutzung der zwei folgenden hypothetischen Wege aktiviert haben:

Die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit LPS führt zu einer gesteigerten Verfügbarkeit der sPLA₂ auf prä- oder posttranskriptioneller Ebene. Im Rahmen der 24-stündigen Stimulation der CaCo-2B-Zellen mit LPS könnten so erhebliche Mengen an sPLA₂ synthetisiert werden, die in den Extrazellularraum sezerniert werden. Sowohl das Nährmedium als auch das Versuchsmedium enthielten Calcium, das zur Enzymbindung an Oberflächenrezeptoren der CaCo-2B-Zellen sowie zur Enzymaktivierung notwendig ist.

Durch die enzymatische Aktivität der sPLA₂ kommt es nachfolgend zur Anreicherung freier Arachidonsäure im Extrazellularraum, die den co-inkubierten PMN als Substrat für die Leukotriensynthese zur Verfügung steht. Um die granulozytäre 5-Lipoxygenase zu aktivieren, ist ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration notwendig, die durch Zugabe von A 23187 erzielt wird (70,74). Voraussetzung für die mögliche Gültigkeit dieser Hypothese ist, dass die sPLA₂ an die Oberfläche der CaCo-2B-Zellen gebunden ist, sonst wäre beim Wechsel des Inkubationsmediums zwei Stunden vor Hinzugabe der Granulozyten und des A 23187 der überwiegende Anteil der sPLA₂ neben der bis dahin freigesetzten Arachidonsäure entfernt worden.

Steigert LPS alternativ die Verfügbarkeit der cPLA₂ auf prä- oder posttranskriptioneller Ebene, würde dies zu Akkumulation von cPLA₂-Protein im Zytoplasma der CaCo-2B-Zellen führen. Nach Stimulation mit A 23187 käme es, getriggert durch den intrazellulären Calciumanstieg, zur Translokation des Enzyms zur Zellkernmembran mit anschließender Enzymaktivierung. Eine Arbeit zeigte, dass LPS in hepatischen Makrophagen zusätzlich die Phosphorylierung der cPLA₂ induziert. Diese bewirkte eine Erhöhung der *intrinsischen*-Aktivität des Enzyms, beeinflusste jedoch nicht die Calciumabhängigkeit der Enzymaktivität, wobei die Datenlage jedoch nicht ganz einheitlich ist (192). Nicht geklärt ist, ob die intrazellulär von der cPLA₂ freigesetzte Arachidonsäure in relevanten Mengen in den Extrazellularraum sezerniert wird, wo sie den co-inkubierten PMN zur Leukotriensynthese zur Verfügung stehen würde. Weiterhin ist unklar, ob diese hypothetischen Vorgänge mit ausreichender Geschwindigkeit in den CaCo-2B-Zellen ablaufen, damit innerhalb der Stimulationszeit von 15 Minuten die erforderliche Arachidonsäure-Konzentration extrazellulär der CaCo-2B-Zellen erreicht werden kann, um die nachgewiesene Amplifikation der granulozytären Leukotriensynthese hinreichend zu erklären.

Im Gegensatz hierzu wäre der supprimierende Einfluss Zytokin-vorbehandelter und nativer CaCo-2B-Zellen auf die granulozytäre Leukotriensynthese durch folgende hypothetische Abläufe erklärbar:

Ein ausbleibender extrazellulärer AA-Anstieg nach Hinzugabe von A 23187 erklärt den fehlenden amplifizierenden Einfluss auf die granulozytäre Leukotriensynthese. Ursächlich dafür könnte eine fehlende Induktion einer PLA₂ bzw. die überwiegende cPLA₂-Aktivierung mit vornehmlicher intrazellulärer AA-Freisetzung in den CaCo-2B-Zellen durch Zytokinvorbehandlung sein. Parallel dazu müsste die granulozytäre Leukotriensynthese durch die CaCo-2B-Zellen direkt supprimiert werden. Ob dies auch

durch NO vermittelt wird, oder andere bislang unbekannte Mechanismen daran beteiligt sind, ist derzeit spekulativ. Dieser Mechanismus dürfte jedoch im Rahmen der vermuteten kooperativen Eicosanoidsynthese zwischen LPS-vorbehandelten CaCo-2B-Zellen und PMN aufgrund der hohen extrazellulären AA-Konzentration nicht ins Gewicht fallen.

Daten über die Induzierbarkeit von PLA₂ in CaCo-2B-Zellen durch Zytokine wie TNF α und IL-1 β liegen bislang nicht vor. Daten mit anderen Zelllinien zeigen diesbezüglich differierende Ergebnisse (193-195).

4.6 Ausblick

Klinisch etablierte Therapieansätze zur Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen basieren u.a. auf der Applikation von 5-Aminosalizylaten und Glucocorticoiden (196,197). In 60 – 80 % der Patienten kann hierdurch eine Remission erzielt werden. Oft ist jedoch nach Dosisreduktion eine erneute Zunahme der Krankheitsaktivität zu beobachten, was zum Einsatz immunsuppressiver Medikamente zwingt. Bei ca. 15 % der Patienten mit M. Crohn ist die bislang etablierte immunsuppressive Therapie unwirksam. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa ist der Anteil therapierefraktärer Verläufe niedriger (196,197). Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Therapeutika notwendig, die im Vergleich zu den konventionellen Massnahmen wirksam und auch nebenwirkungsärmer sind, und die Behandlung steroidrefraktärer Verläufe erlauben.

Die grössten Erfahrungen liegen derzeit beim M. Crohn mit Antikörpern gegen TNF α bzw. den TNF α -Rezeptor vor. Bezüglich anderer die Zytokinantwort modulierender Optionen gibt es neue experimentellen Daten und laufende klinische Studien (198).

Neben Makrophagen und T-Zellen sind PMN in grossem Maß an der Pathogenese CED beteiligt, sodass deren gezielte Modulation ein prinzipieller therapeutischer Ansatz wäre. Im Rahmen des inflammatorischen Geschehens kommt es zur Synthese der sehr selektiven und potenten Granulozytenaktivatoren IL-8 und LTB₄. Hypothetische Optionen wären z.B. die Blockade der granulozytären IL-8- und LTB₄-Signaltransduktionswege oder die Hemmung der IL-8 und LTB₄-Synthese. In der vorliegenden Arbeit konnte zumindest für LPS die Hypothese aufgestellt werden, dass es durch Induktion der PLA₂ mit nachfolgendem Fettsäuretransfer zur massiven Amplifizierung der granulozytären LTB₄-Synthese kommt. Vergleichbare experimentelle Untersuchungen mit anderen Zelllinien bestätigten für proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 β , INF γ und PAF die

Fähigkeit zur Induktion der sPLA₂. Eine Hemmung der (s)PLA₂ könnte die kooperative Eicosanoidsynthese zwischen PMN und intestinalen Epithelzellen unterbrechen und so die LTB₄-induzierte Granulozytenaktivierung deutlich reduzieren.

Bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen ist NO, synthetisiert durch die iNOS der ortsständigen Zellen und von eingewanderten Zellen des Immunsystems, nicht nur ein Marker für die Krankheitsaktivität, sondern ein potenter proinflammatorischer Mediator. Die gezielte Hemmung der gesteigerten NO-Synthese durch die iNOS ist Ziel der therapeutischen Intervention im NO-Stoffwechsel bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen. Die vorliegenden Daten sprechen auch in dem untersuchten Modell für eine wichtige homöostatische Rolle der cNOS-assoziierten NO-Synthese unter inflammatorischen Bedingungen. Die Entwicklung hochselektiver nicht toxischer Hemmstoffe der induzierbaren NO-Synthase ist derzeit Gegenstand der Forschung und könnte möglicherweise ein neues therapeutisches Prinzip in der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen sein.

4.7 Zusammenfassung - Summary

Native CaCo-2B-Zellen sind in der Lage, die destruktiven granulozytären Zelleraktionen abzuschwächen, wenn sowohl die neutrophilen Granulozyten als auch die CaCo-2B-Zellen durch das Calciumionophor A 23187 aktiviert werden (160). In der vorliegenden Arbeit konnte jetzt aufgezeigt werden, dass auch die Vorbehandlung der CaCo-2B-Zellen mit proinflammatorischen Mediatoren dieses Interaktionsmuster nicht verändert. Bekannt ist, dass die Verminderung der nachweisbaren granulozytären Elastase und Sauerstoffradikale bei Co-Inkubation von PMN und nativen CaCo-2B-Zellen mit grosser Wahrscheinlichkeit durch NO vermittelt wird (160). Nach Auswertung der vorliegenden Ergebnisse vermuten wir, dass dies auch bei vorbehandelten CaCo-2B-Zellen der Fall ist. Die Inkubation der CaCo-2B-Zellen mit TNF α bzw. den Zytokingemischen führte über die sehr wahrscheinliche Induktion der iNOS zur Synthese großer Mengen NO. LPS induzierte einen nicht-signifikanten Anstieg der NO-Synthese, den wir einer geringeren Aktivierung der iNOS zuschreiben. Parallel erwarten wir in allen Versuchsreihen nach Stimulation mit A 23187 auch eine Aktivierung der cNOS in den CaCo-2B-Zellen.

In Folge einer erhöhten NO-Konzentration könnte zum einen die membranständige Komponente der granulozytären NADPH-Oxidase gehemmt worden sein. Zum anderen könnte NO mit dem Superoxid-Anion zu dem instabilen Peroxynitrit reagiert haben, das

rasch zum chemisch inerten Nitrat und Nitrit zerfällt. Daten, die das Dominieren eines der Reaktionswege nachweisen, liegen bislang nicht vor. Weiterhin ist anzunehmen, dass über diese Mechanismen hinaus neben dem NO der iNOS das von der cNOS synthetisierte NO an der Supprimierung der granulozytären Sauerstoffradikalbildung beteiligt ist. Klinische Daten lassen zusätzlich vermuten, dass das durch die cNOS synthetisierte NO auch unter inflammatorischen Bedingungen weiterhin antiinflammatorische und homöostatische Funktionen erfüllt (109,183,199). Reaktionen, über die NO direkt die granulozytäre Elastasesekretion hemmen kann, sind derzeit unklar. Der hypothetische Mechanismus über eine Aktivierung des Leukozyten-Serinprotease-Inhibitors bleibt weiterhin spekulativ.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob die Co-Inkubation von nativen und vorbehandelten CaCo-2B-Zellen und PMN und nachfolgende Stimulation mit A 23187 einen Einfluss auf die granulozytäre Leukotriensynthese hat.

Die Co-Inkubation LPS-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen mit PMN führte zu einer massiven Amplifizierung der granulozytären Leukotriensynthese. Der Mechanismus der kooperativen Eicosanoidsynthese zwischen PMN und LPS-vorbehandelten CaCo-2B-Zellen ist vorerst noch hypothetisch. Wir postulieren eine erhöhte Kapazität der PLA₂, wobei über den Anteil der sPLA₂ und cPLA₂ keine Aussage getroffen werden kann. Interessant erscheint allerdings der Hinweis, dass klinische Untersuchungen der letzten Jahre eine bedeutende pathogenetische Rolle der sPLA₂ in der Genese von CED nachgewiesen haben (199-201). Zytokin-vorbehandelte CaCo-2B-Zellen zeigten einen supprimierenden Einfluss auf die granulozytäre Leukotriensynthese. Dies ließe sich durch eine fehlende kooperative Eicosanoidsynthese in Kombination mit einem direkten hemmenden Einfluss Zytokin-vorbehandelter CaCo-2B-Zellen auf die granulozytäre Leukotriensynthese zu erklären. Wie diese hypothetischen Mechanismen im Detail ablaufen und ob möglicherweise NO auch hier eine wichtige Rolle spielt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Native CaCo-2B-cells are able to mitigate destructive granulocytic cell reactions provided both the neutrophil granulocytes and the CaCo-2B-cells are activated by calcium ionophore A 23187 (160). This work shows that even pretreatment of the CaCo-2B-cells with proinflammatory mediators does not change this pattern of interaction. It is known that the reduction of detectable granulocytic elastase and oxygen radicals during the co-incubation of PMN and native CaCo-2B-cells is most probably precipitated by NO (160). Since evaluating the available results, we assume that this is also the case with pre-treated

CaCo-2B-cells. The incubation of CaCo-2B-cells with TNF α and cytokine mixtures respectively led to the synthesis of large quantities of NO, most likely due to the induction of iNOS. LPS induced an insignificant increase in NO synthesis, which we attribute to a lesser degree of iNOS activation. Parallel to this, we expect that every series of experiments will show that cNOS is activated in the CaCo-2B-cells after stimulation with A 23187.

Firstly, increased concentrations of NO could have inhibited the membranous components of granulocytic NADPH oxidase. Secondly, NO could have reacted with the superoxide anion to form peroxynitrite, which is unstable and rapidly decomposes into chemically inert nitrate and nitrite. As yet, there is no data to indicate that either of these reaction paths predominates. In addition to these mechanisms, it is presumed that both the NO synthesized via iNOS and the NO synthesised via cNOS play a part in the inhibition of granulocytic oxygen radical formation. Moreover, clinical data provide grounds for the assumption that the NO synthesized via cNOS performs anti-inflammatory and homeostatic functions even in inflammatory conditions (109,183,199). Reactions by means of which the NO could directly inhibit the secretion of granulocytic elastase are as yet unclear. The hypothetical mechanism involving the activation of leukocyte serine protease inhibitors is still a matter of speculation.

The second part of this work examines whether the co-incubation of native and pre-treated CaCo-2B-cells and PMN and subsequent stimulation with A 23187 can exert an influence on granulocytic leukotriene synthesis.

The co-incubation of PMN and CaCo-2B-cells pretreated with LPS led to a massive increase in granulocytic leukotriene synthesis. At present, the mechanism of cooperative eicosanoid synthesis between PMN and CaCo-2B-cells pre-treated with LPS is still hypothetical. We suggest an increase in PLA₂ capacities, although no statement can be made concerning the proportions of sPLA₂ and cPLA₂. However, it is interesting to note that clinical tests performed in recent years have demonstrated that sPLA₂ plays a significant pathogenetic role in the etiology of CED (199-201). CaCo-2B-cells pretreated with cytokines were showed to inhibit granulocytic leukotriene synthesis. This could be explained by the lack of cooperative eicosanoid synthesis in combination with the directly inhibitive effect of CaCo-2B-cells pretreated with cytokines on granulocytic leukotriene synthesis. At present, no explanation is available as to the detailed progression of these hypothetical mechanisms and whether NO also plays an important part in this context.

5. Literaturverzeichnis

1. Kaser, A., Zeissig, S., Blumberg, R.S.
Inflammatory bowel disease.
Annu Rev Immunol. 2010;28: 573-621
2. Shanahan, F.
Crohn`s disease.
Lancet. 2002;359(9300): 62-69
3. Podolsky, D.K.
Inflammatory bowel disease (1).
N Engl J Med. 1991;325(13): 928-937
4. Shanahan, F.
Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and
ecotherapeutics.
Gastroenterology. 2001;120(3): 622-635
5. Neurath, M.F., Schurmann, G.
Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease.
Chirurg. 2000;71(1): 30-40
6. Sartor, R.B.
Review article: role of enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation
and arthritis.
Aliment Pharmacol Ther. 1997;11(Suppl.3): 17-22; discussion 22-23
7. Noomen, C.G., Hommes, D.W., Fidder, H.H.
Update on genetics in inflammatory disease.
Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2009;23(2): 233-243
8. Cuthbert, A.P., Fisher, S.A., Mirza, M.M., King, K., Hampe, J., Croucher, P.J.,
Mascheretti, S., Sanderson, J., Forbes, A., Mansfield, J., Schreiber, S., Lewis, C.M.,
Mathew, C.G.
The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory
bowel disease.
Gastroenterology. 2002;122(4): 867-874
9. Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H.,
Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M.,
Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nuñez, G., Cho, J.H.

- A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.
Nature. 2001;411(6837): 603-606
10. Nathan, C.
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.
FASEB J. 1992;6(12): 3051-3064
11. Mudter, J., Neurath, M.F.
Die Rolle von Zytokinen in der Pathogenese und Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.
Bundesgesundheitsb-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz. 2003;46(3): 217-224
12. Sandborn, W.J., Landers, C.J., Tremaine, W.J., Targan, S.R.
Association of antineutrophil cytoplasmic antibodies with resistance to treatment of left-sided ulcerative colitis: results of a pilot study.
Mayo Clin Proc. 1999;71(5): 431-436
13. von Ritter, C.
Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen. Pathophysiologie und medikamentöse Therapie.
Radiologe. 1998;38(1): 3-7
14. Gent, A.E., Hellier, M.D., Grace, R.H., Swarbrick, E.T., Coggon, D.
Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy.
Lancet. 1994;343(8900): 766-767
15. Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., Lochs, H.
Mucosal flora in inflammatory bowel disease.
Gastroenterology. 2002;122(1): 44-54
16. von Ritter, C.
The role of increased intestinal permeability in inflammatory bowel disease.
In Goebell (ed): Inflammatory bowel disease: current status and future approach.
Kluwer Academic Publishers Dordrecht 1988; 45-48
17. Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Mayet, W., Ewe, K., Meyer zum Büschenfelde, K.H.
Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD).
Clin Exp Immunol. 1995;102(3): 448-455
18. Qiao, L., Schürmann, G., Betzler, M., Meuer, S.C.

- Activation and signaling status of human lamina propria T-lymphocytes.
Gastroenterology. 1991;101(1): 1529-1536
19. Braunstein, J., Qiao, L., Autschbach, F., Schürmann, G., Meuer, S.
T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10.
Gut. 1997;41(2): 215-220
20. Boirivant, M., Pica, R., DeMaria, R., Testi, R., Pallone, F., Strober, W.
Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis.
J Clin Invest. 1996;98(11): 2616-2622
21. MacDermott, R.P.
Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease.
J Gastroenterol. 1996;31(6): 907-916
22. Holtmann, M., Mudter, J., Galle, P.R., Neurath, M.F.
Das mukosale Immunsystem. Wie klar ist die Pathophysiologie?
Internist. 2002;43(11): 1343-1353
23. Barbutescu, K., Becker, C., Schlaak, J.F., Schmitt, E., Meyer zum Büschenfelde, K.H.,
Neurath, M.F.
IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-
gamma promotor in primary CD4+ T lymphocytes.
J Immunol. 1998;160(8): 3642-3647
24. McCormack, G., Moriarty, D., O'Donoghue, D.P., McCormick, P.A., Sheahan, K.,
Baird, A.W.
Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease.
Inflamm Res. 2001;50(10): 491-495
25. Shanahan, F.
Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut V. Mechanisms of immunologic
sensation of intestinal contents.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000;278(2): G191-G196
26. MacDermott, R.P.
Chemokines in the inflammatory bowel diseases.
J Clin Immunol. 1999;19(5): 266-272
27. Guslandi, M.
Nitric oxide and inflammatory bowel diseases.
Eur J Clin Invest. 1998;28(11): 904-907
28. Del Maestro, R.F., Planker, M., Arfors, K.E.

Evidence for the participation of superoxide anion radical in altering the adhesive interaction between granulocytes and endothelium, in vivo.

Int J Microcirc Clin Exp. 1982;1(2): 105-120

29. Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P.A., Schölmerich, J., Gross, V.

Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa.

Gastroenterology. 1998;115(2): 357-369

30. Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., de la Motte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C., Strober, W.

Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5.

J Immunol. 1996;157(3): 1261-1270

31. Fuss, I.J., Marth, T., Neurath, M.F., Pearlstein, G.R., Jain, A., Strober, W.

Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice.

Gastroenterology. 1999;117(5): 1078-1088

32. Boirivant, M., Marini, M., Di Felice, G., Pronio, A.M., Montesani, C., Tersigni, R., Strober, W.

Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis.

Gastroenterology. 1999;116(3): 557-565

33. Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schütz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J.F., Lehr, H.A., Autschbach, F., Schürmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P.R., Rose-John, S., Neurath, M.F.

Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo.

Nat Med. 2000;6(5): 583-588

34. Papadakis, K.A.

Chemokines in inflammatory bowel disease.

Curr Allergy Asthma Rep. 2004;4(1): 83-89

35. Adams, D.H., Lloyd, A.R.

- Chemokines: leukocyte recruitment and activation cytokines.
Lancet. 1997;349(9050): 490-495
36. Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B.
Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines.
Adv Immunol. 1994;55: 97-179
37. Baggiolini, M.
Chemokines and leukocyte traffic.
Nature. 1998;392(6676): 565-568
38. Remick, D.G., Villarete, L.
Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates.
J Leukoc Biol. 1996;59(4): 471-475
39. DeForge, L.E., Fantone, J.C., Kenney, J.S., Remick, D.G.
Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood.
J Clin Invest. 1992;90(5): 2123-2129
40. Kucharzik, T., Lügering, N., Pauels, H.G., Domschke, W., Stoll, R.
IL-4, IL-10 and IL-13 down-regulate monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1) production in activated intestinal epithelial cells.
Clin Exp Immunol. 1998;111(1): 152-157
41. Murphy, P.M.
Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis.
Cytokine Growth Factor Rev. 1996;7(1): 47-64
42. Springer, T.A.
Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.
Cell. 1994;76(2): 301-314
43. Butcher, E.C., Picker, L.J.
Lymphocyte homing and homeostasis.
Science. 1996;272(5258): 60-66
44. Witt, D.P., Lander, A.D.
Differential binding of chemokines to glykosaminoglycan subpopulations.
Curr Biol. 1994;4(5): 394-400
45. Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., Shaw, S.

T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1beta.

Nature. 1993;361(6407): 79-82

46. Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., Kishimoto, T.

Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC-chemokine PBSF/SDF-1.

Nature. 1996;382(6592): 635-638

47. Strieter, R.M., Standiford, T.J., Huffnagle, G.B., Colletti, L.M., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L.

"The good, the bad, and the ugly." The role of chemokines in models of human disease.

J Immunol. 1996;156(10): 3583-3586

48. Kunkel, S.L., Lukacs, N., Kasama, T., Strieter, R.M.

The role of chemokines in inflammatory joint disease.

J Leukoc Biol. 1996;59(1): 6-12

49. Charo, I.F., Taubman, M.B.

Chemokines in the pathogenesis of vascular disease.

Circ Res. 2004;95(9): 858-866

50. Mitsuyama, K., Toyonaga, A., Sasaki, E., Watanabe, K., Tateishi, H., Nishiyama, T., Saiki, T., Ikeda, H., Tsuruta, O., Tanikawa, K.

IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease.

Clin Exp Immunol. 1994;96(3): 432-436

51. Furie, M.B., Randolph, G.J.

Chemokines and tissue injury.

Am J Pathol. 1995;146(6): 1287-1301

52. Ben-Baruch, A., Michiel, D.F., Oppenheim, J.J.

Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells.

J Biol Chem. 1995;270(20): 11703-11706

53. Reimund, J.M., Wittersheim, C., Dumont, S., Muller, C.D., Baumann, R., Poindron, P., Duclos, B.

Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease.

J Clin Immunol. 1996;16(3): 144-150

54. O'Neil, D., Steidler, L.

Cytokines, chemokines and growth factors in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease.

Adv Exp Med Biol. 2003;520: 252-285

55. Ajuebor, M.N., Swain, M.G.

Role of chemokines and chemokine receptors in the gastrointestinal tract.

Immunology. 2002;105(2): 137-143

56. Jiang, Y., Beller, D.I., Frenzl, G., Graves, D.T.

Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes.

J Immunol. 1992;148(8): 2423-2428

57. Valente, A.J., Graves, D.T., Vialle-Valentin, C.E., Delgado, R., Schwartz, C.J.

Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture.

Biochemistry. 1988;27(11): 4162-4168

58. Yoshimura, T., Leonard, E.J.

Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes.

J Immunol. 1990;145(1): 292-297

59. Graves, D.T., Barnhill, R., Galanopoulos, T., Antoniadis, H.N.

Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human melanoma in vivo.

Am J Pathol. 1992;140(1): 9-14

60. Graves, D.T., Valente, A.J.

Monocyte chemotactic proteins from human tumor cells.

Biochem Pharmacol. 1991;41(3): 333-337

61. Rollins, B.J., Walz, A., Baggiolini, M.

Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes.

Blood. 1991;78(4): 1112-1116

62. Matsushima, K., Larsen, C.G., DuBois, G.C., Oppenheim, J.J.

Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line.

J Exp Med. 1989;169(4): 1485-1490

63. Rollins, B.J., Sunday, M.E.

Suppression of tumor formation in vivo by expression of the JE gene in malignant cells.

Mol Cell Biol. 1991;11(6): 3125-3131

64. Nelken, N.A., Coughlin, S.R., Gordon, D., Wilcox, J.N.

Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques.

J Clin Invest. 1991;88(4): 1121-1127

65. Grimm, M.C., Elsbury, S.K., Pavli, P., Doe, W.F.

Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa.

J Leukoc Biol. 1996;59(6): 804-812

66. Sparkman, L., Boggaram, V.

Nitric oxide increases IL-8 gene transcription and mRNA stability to enhance IL-8 gene expression in lung epithelial cells.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004;287(4): L764-L773

67. Pohlman, T.H., Stanness, K.A., Beatty, P.G., Ochs, H.D., Harlan, J.M.

An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism.

J Immunol. 1986;136(12): 4548-4553

68. Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., Kracht, M.

Multiple control of interleukin-8 gene expression.

J Leukoc Biol. 2002;72(5): 847-855

69. Samuelsson, B., Dahlén, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A., Serhan, C.N.

Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects.

Science. 1987;237(4819): 1171-1176

70. Haeggström, J.Z., Wetterholm, A.

Enzymes and receptors in the leukotriene cascade.

Cell Mol Life Sci. 2002;59(5): 742-753

71. Grimminger, F., Sibelius, U., Seeger, W.

Amplification of LTB₄-generation in AM-PMN cocultures: transcellular 5-lipoxygenase metabolism.

Am J Physiol. 1991;261(2 Pt 1): L195-L203

72. Amat, M., Díaz, C., Vila, L.

Leukotriene A₄-hydrolase and leukotriene C₄-synthase activities in human chondrocytes: transcellular biosynthesis of leukotrienes during granulocyte-chondrocyte- interaction.

Arthritis Rheum. 1998;41(9): 1645-1651

73. Walsh, C.E., Waite, B.M., Thomas, M.J., DeChatelet, L.R.
Release and metabolism of arachidonic acid in human neutrophils.
J Biol Chem. 1981;256(14): 7228-7234
74. Borgeat, P.
Biochemistry of the lipoxygenase pathways in neutrophils.
Can J Physiol Pharmacol. 1989;67(8): 936-942
75. Steinhilber, D.
5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity.
Pharm Acta Helv. 1994;69(1): 3-14
76. Letari, O., Malgaroli, A., Morgan, D.W., Welton, A.F., Nicosia, S.
Cytosolic calcium ion and arachidonic acid release and metabolism in macrophages.
Eur J Pharmacol. 1991;206(3): 211-219
77. Ford-Hutchinson, A.W.
Leukotriene B4 in inflammation.
Crit Rev Immunol. 1990;10(1): 1-12
78. Henderson, W.R. Jr.
The role of leukotrienes in inflammation.
Ann Intern Med. 1994;121(9): 684-697
79. McDonald, P.P., McColl, S.R., Braquet, P., Borgeat, P.
Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B4 and platelet-activating factor in human neutrophils.
Br J Pharmacol. 1994;111(3): 852-860
80. Hatzelmann, A., Fruchtmann, R., Mohrs, K.H., Raddatz, S., Müller-Peddinghaus, R.
Ca²⁺ ionophore A23187-stimulated secretion of azurophil granules in human polymorphonuclear leukocytes is largely mediated by endogenously formed leukotriene B4.
Biochem Pharmacol. 1994;48(1): 31-39
81. Stanková, J., Rola-Pleszczynski, M.
Leukotriene B4 stimulates c-fos and c-jun gene transcription and AP-1 binding activity in human monocytes.
Biochem J. 1992;282(Pt 3): 625-629
82. Rola-Pleszczynski, M., Bouvrette, L., Gingras, D., Girard, M.
Identification of interferon-gamma as the lymphokine that mediates leukotriene B4-induced immunoregulation.

J Immunol. 1987;139(2): 513-517

83. Murphy, R.C., Hammarström, S., Samuelsson, B.

Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells.

Proc Natl Acad Sci USA. 1979;76(9): 4275-4279

84. Maclouf, J., Sala, A., Rossoni, G., Berti, F., Müller-Peddinghaus, R., Folco, G.

Consequences of transcellular biosynthesis of leukotriene C4 on organ function.

Hemostasis. 1996;26(Suppl.4): 28-36

85. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V.

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.

Nature. 1980;288(5789): 373-376

86. Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S.

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.

Nature. 1987;327(6122): 524-526

87. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G.

Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.

Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84(24): 9265-9269

88. Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A.

Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology.

Pharmacol Rev. 1991;43(2): 109-142

89. Becker, B.F., Kupatt, C., Massoudy, P., Zahler, S.

Reactive oxygen species and nitric oxide in myocardial ischemia and reperfusion.

Z Kardiol. 2000;89(Suppl.9): IX/88-91

90. Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N.

Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion.

Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88(11): 4651-4655

91. Clancy, R.M., Amin, A.R., Abramson, S.B.

The role of nitric oxide in inflammation and immunity.

Arthritis Rheum. 1998;41(7): 1141-1151

92. Johnson, M.L., Billiar, T.R.

Roles of nitric oxide in surgical infection and sepsis.

World J Surg. 1998;22(2): 187-196

93. De Cruz, S.J., Kenyon, N.J., Sandrock, C.E.
Bench-to-bedside review: the role of nitric oxide in sepsis.
Expert Rev Respir Med. 2009;3(5): 511-521
94. Endres, S., Eigler, A.
Hemmung der NO-Synthase im septischen Schock. Therapeutische Grenzen und Perspektiven.
Internist. 1997;38(5): 466-469
95. Cho, H.J., Xie, Q.W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Nathan, C.
Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages.
J Exp Med. 1992;176(2): 599-604
96. Schmidt, H.H., Lohmann, S.M., Walter, U.
The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action.
Biochem Biophys Acta. 1993;1178(2): 153-175
97. Moncada, S., Higgs, A.
The L-arginine-nitric oxide pathway.
N Engl J Med. 1993;329(27): 2002-2012
98. Stichtenoth, D.O.
Stickstoffmonoxid. Mediator oder Marker der chronischen Entzündung?
Internist. 1997;38(5): 420-426
99. Nathan, C., Xie, Q.W.
Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls.
Cell. 1994;78(6): 915-918
100. Stuehr, D.J., Griffith, O.W.
Mammalian nitric oxide synthases.
Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1992;65: 287-346
101. Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., Kleinert, H.
Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning and functions.
Hypertension. 1994;23(6 Pt 2): 1121-1131
102. Nussler, A.K., Billiar, T.R.
Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase.

J Leukoc Biol. 1993;54(2): 171-178

103. Tsukahara, Y., Morisaki, T., Horita, Y., Torisu, M., Tanaka, M.

Expression of inducible nitric oxide synthase in circulating neutrophils of the systemic inflammatory response syndrome and septic patients.

World J Surg. 1998;22(8): 771-777

104. Geller, D.A., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A.,

Wang, S.C., Simmons, R.L., Billiar, T.R.

Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes.

Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90(2): 522-526

105. Stamler, J.S., Singel, P.J., Loscalzo, J.

Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms.

Science. 1992;258(5090): 1898-1902

106. Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Stamler, J.S.

S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control.

Nature. 1996;380(6571): 221-226

107. Crow, J.P., Beckman, J.S.

Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo.

Adv Pharmacol. 1995;34: 17-43

108. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A.

Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.

Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87(4): 1620-1624

109. Pfeilschifter, J., Eberhardt, W., Hummel, R., Kunz, D., Mühl, H., Nitsch, D.,

Plüss, C., Walker, G.

Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase--potential for a novel class of anti-inflammatory agents.

Cell Biol Int. 1996;20(1): 51-58

110. Van Dervort, A.L., Yan, L., Madara, P.J., Cobb, J.P., Wesley, R.A., Corriveau, C.C.,

Tropea, M.M., Danner, R.L.

Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF-alpha production by human neutrophils.

J Immunol. 1994;152(8): 4102-4109

111. Salvemini, D., Misko, T.P., Masferrer, J.L., Seibert, K., Currie, M.G., Needleman, P.

Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes.

Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90(15): 7240-7244

112. Hibbs, J.B. Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M.

Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule.

Biochem Biophys Res Commun. 1988;157(1): 87-94

113. Karupiah, G., Xie, Q.W., Buller, R.M., Nathan, C., Duarte, C., MacMicking, J.D.

Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase.

Science. 1993;261(5127): 1445-1448

114. Gaboury, J., Woodman, R.C., Granger, D.N., Reinhardt, P., Kubes, P.

Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide.

Am J Physiol. 1993;265(3 Pt 2): H862-H867

115. Biffl, W.L., Moore, E.E., Moore, F.A., Barnett, C.

Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1.

J Surg Res. 1996;63(1): 328-332

116. Bian, K., Doursout, M.F., Murad, F.

Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases.

J Clin Hypertens (Greenwich). 2008;10(4): 304-310

117. Kimura, H., Miura, S., Shigematsu, T., Ohkubo, N., Tsuzuki, Y., Kurose, I.,

Higuchi, H., Hokari, R., Hirokawa, M., Serizawa, H., Ishii, H.

Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease.

Dig Dis Sci. 1997;42(5): 1047-1054

118. Salzman, A.L., Eaves-Pyles, T., Linn, S.C., Denenberg, A.G., Szabó, C.

Bacterial induction of inducible nitric oxide synthase in cultured human intestinal epithelial cells.

Gastroenterology. 1998;114(1): 93-102

119. Richter, C.

Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and respiration.

Biosci Rep. 1997;17(1): 53-66

120. Nadler, E.P., Ford, H.R.

Regulation of bacterial translocation by nitric oxide.

Pediatr Surg Int. 2000;16(3): 165-168

121. Unno, N., Menconi, M.J., Smith, M., Fink, M.P.

Nitric oxide mediates interferon-gamma-induced hyperpermeability in cultured human intestinal epithelial monolayers.

Crit Care Med. 1995;23(7): 1170-1176

122. Junqueira, L.C., Carneiro, J.

Blut.

In Junqueira, L.C., Carneiro, J. (ed): *Histologie.*

Springer-Verlag Heidelberg 1991; 308-341

123. Gordon, M.Y.

Origin and development of neutrophils.

In Hellewell, P.G., Williams, T.J. (ed): *Immunopharmacology of neutrophils.*

Academia Press London 1994; 5-26

124. Larsen, C.G., Anderson, A.O., Appella, E., Oppenheim, J.J., Matsushima, K.

The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes.

Science. 1989;243(4897): 1464-1466

125. Smith, J.A.

Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword.

J Leukoc Biol. 1994;56(6): 672-686

126. Weiss, S.J.

Tissue destruction by neutrophils.

N Engl J Med. 1989;320(6): 365-376

127. Hoffman, J.W. Jr., Gilbert, T.B., Poston, R.S., Silldorff, E.P.

Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies.

J Extra Corpor Technol. 2004;36(4): 391-411

128. Pillinger, M.H., Abramson, S.B.

The neutrophil in rheumatoid arthritis.

Rheum Dis Clin North Am. 1995;21(3): 691-714

129. Mohàcsi, A., Kozlovsky, B., Kiss, I., Seres, I., Fülöp, T. Jr.

Neutrophils obtained from obliterative atherosclerotic patients exhibit enhanced resting respiratory burst and increased degranulation in response to various stimuli.

Biochem Biophys Acta. 1996;1316(3): 210-216

130. Baldrige, C.W., Gerhard, R.N.

The extra respiration of phagozytosis.

Am J Physiol. 1933;103: 235-236

131. Casimir, C.M., Teahan, C.G.

The respiratory burst of neutrophils and its deficiency.

In Hellewell, P.G., Williams, T.J. (ed): Immunopharmacology of neutrophils.

Academia Press London 1994; 27-54

132. Rotrosen, D., Yeung, C.L., Leto, T.L., Malech, H.L., Kwong, C.H.

Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase.

Science. 1992;256(5062): 1459-1462

133. Rotrosen, D., Kleinberg, M.E., Nuno, H., Leto, T., Gallin, J.I., Malech, H.L.

Evidence for a functional cytoplasmic domain of the phagocyte oxidase cytochrome b558.

J Biol Chem. 1990;265(15): 8745-8750

134. Babior, B.M.

The respiratory burst oxidase.

Curr Opin Hematol. 1995;2(1): 55-60

135. McPhail, L.C., Sturm, S.L., Leonard, P.A., Sozanni, S.

The neutrophil respiratory burst mechanism.

In Coffey, M. (ed): Granulocyte responses to cytokines.

Dekker Inc New York 1992; 47-76

136. Ward, P.A.

Role of toxic oxygen products from phagocytic cells in tissue injury.

Adv Shock Res. 1983;10: 27-34

137. Katsuragi, H., Ohtake, M., Kurasawa, I., Saito, K.

Intracellular production and extracellular release of oxygen radicals by PMNs and oxidative stress on PMNs during phagocytosis of periodontopathic bacteria.

Odontology. 2003;91(1): 13-18

138. Bainton, D.F.

Neutrophilic leukocyte granules: from structure to function.

Adv Exp Med Biol. 1993;336: 17-33

139. Faurschou, M., Borregaard, N.

Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.

Microbes Infect. 2003;5(14): 1317-1327

140. Klebanoff, S.J.

Myeloperoxidase: friend and foe.

J Leukoc Biol. 2005;77(5): 598-625

141. Fujie, K., Shinguh, Y., Inamura, N., Yasumitsu, R., Okamoto, M., Okuhara, M.

Release of neutrophil elastase and its role in tissue injury in acute inflammation: effect of the elastase inhibitor, FR134043.

Eur J Pharmacol. 1999;374(1): 117-125

142. Weiss, S.J., Peppin, G.J.

Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. Characteristics, regulation and potential function in vivo.

Biochem Pharmacol. 1986;35(19): 3189-3197

143. Molloy, A.L., Winterbourn, C.C.

Release of iron from phagocytosed *Escherichia coli* and uptake by neutrophil lactoferrin.

Blood. 1990;75(4): 984-989

144. Bainton, D.F., Miller, L.J., Kishimoto, T.K., Springer, T.A.

Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils.

J Exp Med. 1987;166(6): 1641-1653

145. Dewald, B., Bretz, U., Baggiolini, M.

Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils.

J Clin Invest. 1982;70(3): 518-525

146. McDonald, J.A., Kelley, D.G.

Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments.

J Biol Chem. 1980;255(18): 8848-8858

147. Travis, J.

Structure, function, and control of neutrophil proteinases.

Am J Med. 1988;84(6A): 37-42

148. Travis, J., Salvesen, G.S.

Human plasma proteinase inhibitors.

Annu Rev Biochem. 1983;52: 655-709

149. Fogh, J., Wright, W.C., Loveless, J.D.

Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.

J Natl Cancer Inst. 1977;58(2): 209-214

150. Riehl, T.E., Bass, N.M., Stenson, W.F.

Metabolism of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid by Caco-2 cells.

J Lipid Res. 1990;31(5): 773-780

151. Matter, K., Stieger, B., Klumperman, J., Ginsel, L., Hauri, H.P.

Endocytosis, recycling, and lysosomal delivery of brush border hydrolases in cultured human intestinal epithelial cells (Caco-2).

J Biol Chem. 1990;265(6): 3503-3512

152. Yoshioka, M., Erickson, R.H., Matsumoto, H., Gum, E., Kim, Y.S.

Expression of dipeptidyl aminopeptidase IV during enterocytic differentiation of human colon cancer (Caco-2) cells.

Int J Cancer. 1991;47(6): 916-921

153. Vachon, P.H., Beaulieu, J.F.

Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line.

Gastroenterology. 1992;103(2): 414-423

154. Luzio, J.P., Jackman, M.R., Ellis, J.A.

Endocytic and transcytic pathways in Caco-2 cells.

Biochem Soc Trans. 1992;20(4): 717-719

155. Wilson, G.

Cell culture techniques for the study of drug transport.

Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 1990;15(2): 159-163

156. Vitkus, S.J., Hanifin, S.A., McGee, D.W.

Factors affecting Caco-2 intestinal epithelial cell interleukin-6 secretion.

In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1998;34(8): 660-664

157. Kaiserlian, D., Rigal, D., Abello, J., Revillard, J.P.

Expression, function and regulation of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human intestinal epithelial cell lines.

Eur J Immunol. 1991;21(10): 2415-2421

158. Si-Tahar, M., Merlin, D., Sitaraman, S., Madara, J.L.

Constitutive and regulated secretion of secretory leukocyte proteinase inhibitor by human epithelial cells.

Gastroenterology. 2000;118(6): 1061-1071

159. Baker, S.S., Baker, R.D. Jr.

Caco-2 cell metabolism of oxygen-derived radicals.

Dig Dis Sci. 1993;38(12): 2273-2280

160. Schäfer, C.A.

Experimentelle Untersuchungen zur Interaktion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und intestinalen Epithelzellen am Beispiel von CaCo-2 Zellen.

Inaugural Dissertation

Justus-Liebig-Universität Giessen 2002

161. Bøyum, A.

Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages.

Scan J Immunol. 1976;(Suppl.5): 9-15

162. Kramps, J.A., van Twisk, C., van der Linden, A.C.

L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-valine-p-nitroanilide, a highly specific substrate for granulocyte elastase.

Scand J Clin Lab Invest. 1983;43(5): 427-432

163. Cohen, H.J., Chovaniec, M.E.

Superoxide-generation by digitonin-stimulated guinea-pig granulocytes. A basis for a continuous assay for monitoring superoxide production and for the study of the activation of the generating system.

J Clin Invest. 1978;61(4): 1081-1087

164. Cox, R.D., Frank, C.W.

Determination of nitrate and nitrite in blood and urine by chemiluminescence.

J Anal Toxicol. 1982;6(3): 148-152

165. Braman, R.S., Hendrix, S.A.

Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection.

Anal Chem. 1989;61(24): 2715-2718

166. Cresser, M.C.

Nitrate determination by reduction to ammonia and gas-phase ultraviolet absorption spectrometry.

Analyst. 1977;102: 99-103

167. Radi, R., Cosgrove, T.P., Beckman, J.S., Freeman, B.A.

Peroxy-nitrite-induced luminol chemiluminescence.

Biochem J. 1993;290: 51-57

168. Greaves, J.C., Garvin, D.

Chemically induced molecular excitation: excitation spectrum of the nitric oxide-ozone system.

J Chem Phys. 1959;30: 348-349

169. Grimminger, F., Becker, G., Seeger, W.

High yield enzymatic conversion of intravascular leukotriene A4 in blood-free

perfused lungs.

J Immunol. 1988;141(7): 2431-2436

170. Mathews, W.R., Rokach, J., Murphy, R.C.

Analysis of leukotrienes by high-pressure liquid chromatography.

Anal Biochem. 1981;118(1): 96-101

171. Stallmach, A., Zeitz, M.

Immunologie des Intestinaltrakts.

In: Caspary, W.F., Stein, J. (ed): Darmkrankheiten. Klinik, Diagnostik und Therapie.

Springer-Verlag Heidelberg 1999; 55-61

172. Kagnoff, M.F., Eckmann, L.

Epithelial cells as sensors for microbial infection.

J Clin Invest. 1997;100(1): 6-10

173. Eckmann, L., Kagnoff, M.F., Fierer, J.

Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry.

Infect Immun. 1993;61(11): 4569-4574

174. Yang, S.K., Eckmann, L., Panja, A., Kagnoff, M.F.

Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells.

Gastroenterology. 1997;113(4): 1214-1223

175. Kreger, B.E., Craven, D.E., McCabe, W.R.

Gram-negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients.

Am J Med. 1980;68(3): 344-355

176. Monajemi, H., Meenan, J., Lamping, R., Obradov, D.O., Radema, S.A., Trown, P.W.,

Tytgat, G.N., Van Deventer, S.J.

Inflammatory bowel disease is associated with increased mucosal levels of bactericidal/permeability-increasing protein.

Gastroenterology. 1996;110(3): 733-739

177. Schuerer-Maly, C.C., Eckmann, L., Kagnoff, M.F., Falco, M.T., Maly, F.E.

Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide.

Immunology. 1994;81(1): 85-91

178. Warhust, A.C., Hopkins, S.J., Warhust, G.

Interferon gamma induces differential upregulation of alpha and beta chemokine secretion

in colonic epithelial cell lines.

Gut. 1998;42(2): 208-213

179. Chavez, A.M., Menconi, M.J., Hodin, R.A., Fink, M.P.

Cytokine-induced intestinal epithelial hyperpermeability: role of nitric oxide.

Crit Care Med. 1999;27(10): 2246-2251

180. Rubanyi, G.M., Ho, E.H., Cantor, E.H., Lumma, W.C., Botelho, L.H.

Cytoprotective function of nitric oxide: interaction of superoxide radicals produced by human leukocytes.

Biochem Biophys Res Commun. 1991;181(3): 1392-1397

181. Clancy, R.M., Leszczynska-Piziak, J., Abramson, S.B.

Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH-oxidase.

J Clin Invest. 1992;90(3): 1116-1121

182. Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., Freeman, B.A.

Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives.

J Biol Chem. 1994;269(42): 26066-26075

183. Liaudet, L., Schaller, M.D.

Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase: A promising strategy in the therapy of septic shock?

Intensivmed. 2000;37: 166-175

184. Cortese, J.F., Spannhake, E.W., Eisinger, W., Potter, J.J., Yang, V.W.

The 5-lipoxygenase pathway in cultured human intestinal epithelial cells.

Prostaglandins. 1995;49(3): 155-166

185. Dias, V.C., Wallace, J.L., Parsons, H.G.

Modulation of cellular phospholipid fatty acids and leukotriene B₄-synthesis in the human intestinal cell (CaCo-2).

Gut. 1992;33(5): 622-627

186. Mayer, R.J., Marshall, L.A.

New insights on mammalian phospholipase A₂(s); comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes.

FASEB J. 1993;7(2): 339-348

187. Burke, J.E., Dennis, E.A.

Phospholipase A2 biochemistry.

Cardiovasc Drugs Ther. 2009;23(1): 49-59

188. Schievella, A.R., Regier, M.K., Smith, W.L., Lin, L.L.

Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmatic reticulum.

J Biol Chem. 1995;270(51): 30749-30754

189. Oka, S., Arita, H.

Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression.

J Biol Chem. 1991;266(15): 9956-9960

190. Tan, X.D., Wang, H., Gonzalez-Crussi, F.X., Chang, H., Gonzalez-Crussi, F., Hsueh, W.

Platelet-activating factor and endotoxin increase the enzyme activity and gene expression of type II phospholipase A2 in the rat intestine. Role of polymorphonuclear leukocytes.

J Immunol. 1996;156(8): 2985-2990

191. Underwood, K.W., Song, C., Kriz, R.W., Chang, X.J., Knopf, J.L., Lin, L.L.

A novel calcium-independent phospholipase A2, cPLA2-gamma, that is prenylated and contains homology to cPLA2.

J Biol Chem. 1998;273(34): 21926-21932

192. Ambs, P., Baccharini, M., Fitzke, E., Dieter, P.

Role of cytosolic phospholipase A2 in arachidonic acid release of rat-liver macrophages: regulation by Ca²⁺ and phosphorylation.

Biochem J. 1995;311(Pt 1): 189-195

193. Grossmann, E.M., Longo, W.E., Mazuski, J.E., Panesar, N., Kaminski, D.L.

Role of cytoplasmatic and secretory phospholipase A2 in intestinal epithelial cell prostaglandin E2 formation.

Int J Surg Investig. 2000;1(6): 467-476

194. Pfeilschifter, J., Schalkwijk, C., Briner, V.A., van den Bosch, H.

Cytokine-stimulated secretion of group II phospholipase A2 by rat mesangial cells.

Its contribution to arachidonic acid release and prostaglandin synthesis by cultured rat glomerular cells.

J Clin Invest. 1993;92(5): 2516-2523

195. Schalkwijk, C.G., de Vet, E., Pfeilschifter, J., van den Bosch, H.

Interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta 2 enhance cytosolic high-

molecular-mass phospholipase A2 activity and induce prostaglandin E2 formation in rat mesangial cells.

Eur J Biochem. 1992;210(1): 169-176

196. Hoffmann, J.C., Preiss, J.C., Autschbach, F., Buhr, H.J., Häuser, W., Herrlinger, K., Höhne, W., Koletzko, S., Krieglstein, C.F., Kruis, W., Matthes, H., Moser, G., Reinshagen, M., Schreiber, S., Schreyer, A.G., Sido, B., Siegmund, B., Stallmach, A., Bokemeyer, B., Stange, E.F., Zeitz, M.

S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des M. Crohn.

Z Gastroenterol. 2008;44: 1094-1146

197. Hoffmann, J.C., Zeitz, M., Bischoff, S.C., Brambs, H.J., Bruch, H.P., Buhr, H.J., Dignass, A., Fischer, I., Fleig, W., Fölsch, U.R., Herrlinger, K., Höhne, W., Jantschek, G., Kaltz, B., Keller, K.M., Knebel, U., Kroesen, A.J., Kruis, W., Matthes, H., Moser, G., Mundt, S., Pox, C., Reinshagen, M., Reissmann, A., Riemann, J., Rogler, G., Schmiegel, W., Schölmerich, J., Schreiber, S., Schwandner, O., Selbmann, H.K., Stange, E.F., Utzig, M., Wittekind, C.

Leitlinie Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa.

Z Gastroenterol. 2004;42: 988-1042

198. Herrlinger, K., Stange, E.F.

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen – neue Therapieansätze.

Med Klin. 2008;103: 90-101

199. Haapamäki, M.M., Grönroos, J.M., Nurmi, H., Alanen, K., Nevalainen, T.J.

Gene expression of group II phospholipase A2 in intestine in Crohn's disease.

Am J Gastroenterol. 1999;94(3): 713-720

200. Touqui, L., Alaoui-El-Azher, M.

Mammalian secreted phospholipases A2 and their pathophysiological significance in inflammatory diseases.

Curr Mol Med. 2001;1(6): 739-754

201. Yamaguchi, O., Sugimura, K., Ishizuka, K., Suzuki, K., Hasegawa, K., Ohtsuka, K., Honma, T., Asakura, H.

Correlation between serum phospholipase A(2) IIA levels and histological activity in patients with ulcerative colitis.

Int J Colorectal Dis. 2002;17(5): 311-316

6. Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ARDS	acute respiratory distress syndrom
A 23186	Ca ²⁺ -Ionophor A 23187
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CaCo-2B-Zellen	humane Kolonadenokarzinom-Zelllinie 2B
CD3-Rezeptor	Oberflächenrezeptor auf Immunzellen
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
C5 _a	Komplementfaktor 5 _a
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.coli	Escherischa coli
EDRF	endothelialer abgeleiteter relaxierender Faktor
FAD	Flavin-Adenindinucleotid
FCS	fetales Kälberserum
FLAP	5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein
fMLP	Formylmethionylleucylphenylalanin, bakterielles Peptid
FMN	Flavinmononucleotid
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-koloniestimulierender Faktor
GTP	Guanosin-Triphosphat
sGC	lösliche Guanylat-Zyklase
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	N-2-hydrylethylpiperazine-N'-2-ethansulfon Säure
HETE/diHETE	Hydroxyeicosatetraensäure/di- Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HLA-Klasse II	Histokompatibilitäts-Klasse II
IEC	intestinale Epithelzellen
INF γ	Interferon- γ
IL-6,-8	Interleukin-6,-8

kDa.....	kilo-Dalton
LO.....	Lipoxygenase
LPS.....	bakterielles Lipopolysaccharid/Endotoxin
LTB/A/C ₄	LeukotrienA/B/C ₄
NADPH.....	Nicotinamidadenindinukleotidtriphosphat
NK-Zelle.....	natürliche Killerzellen
NF _κ -B.....	nukleärer Faktor _κ -B (Transkriptionsfaktor)
NO.....	Stickstoffmonoxid
NOD ²	NOD ² -Gen
NOS.....	NO-Synthase
eNOS.....	konstitutive NO-Synthase
iNOS.....	induzierbare NO-Synthase
MCP-1.....	Monocyte chemoattractant Protein-1
o.g.....	oben genannt
PAF.....	Plättchen-aktivierender Faktor
pANCA.....	perinukleärer anti-Neutrophilen zytoplasmatischer Antikörper
PEN/STREP.....	Penicillin/Streptomycin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMN.....	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PVA.....	Polyvinylalkohol
SLPI.....	sekretorischer Proteaseinhibitor
SOD.....	Superoxid-Dismutase
TGF-β.....	Transforming-growth-Faktor-β
TNFα.....	Tumornekrosefaktor-α
u.a.....	unter anderem
v.a.....	vor allem
z.B.....	zum Beispiel

7. Danksagung

Bei allen, die mich bei der Durchführung der Experimente und der Erstellung dieser Dissertation unterstützen, möchte ich mich hiermit sehr herzlich bedanken.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Seeger, Herrn Prof. Dr. Dr. F. Grimminger und Herrn Prof. Dr. K. Mayer bedanken, die diese Dissertation ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Mayer danke ich darüber hinaus für die engagierte Betreuung. Seine Anregungen und Motivation und die beständige Auseinandersetzung mit dem Thema bildeten die Grundlage für die Entsehung dieser Promotion.

Frau Karin Fietzner und Frau Annette Tschuschner sei Dank gesagt für ihre technische Hilfe mit der sie einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieses Projektes leisteten.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Eltern für Ihre Unterstützung und Ihre nahezu unendliche Geduld.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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 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.“