

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZU ZELL-ZELL-  
INTERAKTIONEN VON PULMONALEPITHELIIEN UND  
GRANULOZYTEN**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Michael Ludwig

aus Giessen

Giessen 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II

Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH, Standort Giessen

Gutachter: Herr PD Dr. Sibelius

Gutachter: Frau PD Dr. Wimmer-Röll

Tag der Disputation: 21.08.2006

*Für Fine  
und  
meine Eltern*

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1-18</b>
<b>I.1</b>	<b>ARDS</b>	<b>1</b>
<b>I.2</b>	<b>ARDS und Inflammation</b>	<b>3</b>
I.2.1	Rolle neutrophiler Granulozyten im ARDS	3
I.2.1.1	Granulozytäre Mechanismen der Inflammation	5
I.2.1.1.1	Degranulierung	5
I.2.1.1.2	Respiratory Burst und reaktive Sauerstoffspezies	8
I.2.2	Rolle der Pulmonalepithelien im ARDS	10
I.2.2.1	Antimikrobielle Peptide und Proteine	10
I.2.2.2	Immunantwort der pulmonalen Epithelzellen	11
I.2.2.3	Antiinflammatorische Mediatoren pulmonaler Epithelien	12
I.2.2.3.1	Adenosin	12
I.2.2.3.2	Stickstoffmonoxid	13
I.2.2.3.3	Eicosanoide	13
<b>I.3</b>	<b>Regulation der granulozytären Aktivität durch Zell-Zell-Interaktionen</b>	<b>16</b>
I.3.1	Thrombozyten	17
I.3.2	Lymphozyten	17
I.3.3	Endothelzellen	17
<b>I.4</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>18</b>

---

<b>II MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>19-26</b>
<b>II.1 Materialien</b>	<b>19</b>
II.1.1 Epithelzellen sowie Materialien und Lösungen für die Inkubation und das Passagieren	19
II.1.2 Kulturgefäße	19
II.1.3 Materialien und Lösungen für die Zellisolation und Inkubation der PMN	19
II.1.4 Materialien und Lösungen für die Elastasemessung	20
II.1.5 Experimentelle Agentien und Pharmaka	20
<b>II.2 Methodik</b>	<b>21</b>
II.2.1 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten	21
II.2.2 Erfassung granulozytärer Funktionsparameter	23
II.2.2.1 Degranulierung	23
II.2.2.2 Respiratorischer Burst	23
II.2.2.3 Statistische Auswertung	24
II.2.3 Kultivierung der Epithelzellen	24
II.2.4 Versuchsdurchführung	25
<b>III ERGEBNISSE</b>	<b>27-48</b>
<b>III.1 Untersuchungen zum Effekt von Bronchialepithelzellen auf destruktive granulozytäre Zellreaktionen.</b>	<b>27</b>
III.1.1 Zelladhäsion und inflammatorisches Granulozytenverhalten	29
III.1.2 Einfluss pharmakologischer Inhibition des Lipidmediatormetabolismus	31
III.1.3 Einfluss von Adenosin auf das inflammatorische Granulozytenverhalten	33
III.1.4 Einfluss pharmakologischer Inhibition der NO-Synthase	39
<b>III.2 Untersuchungen zum Effekt von Alveolarepithelzellen auf destruktive granulozytäre Zellreaktionen.</b>	<b>43</b>
III.2.1 Einfluss pharmakologischer Inhibition des Lipidmediatormetabolismus	46
III.2.2 Einfluss pharmakologischer Inhibition der 5-Lipoxygenase	47

---

<b>IV DISKUSSION</b>	<b>49-57</b>
<b>IV.1 Entwicklung der Fragestellung</b>	<b>49</b>
<b>IV.2 Down-Regulation von Rezeptor(fMLP)- und Ionophor(A23)- induzierter Granulozytenaktivierung durch Bronchialepithelzellen</b>	<b>50</b>
<b>IV.3 Suche nach möglichen Mediatoren der Down-Regulation</b>	<b>51</b>
<b>IV.4 Differenzierung der Induktion mit fMLP bzw. A23</b>	<b>54</b>
<b>IV.5 Steigerung der fMLP-induzierten granulozytären Degranulierung durch Alveolarepithelzellen – Prinzip der kooperativen Eicosanoidsynthese</b>	<b>55</b>
<b>IV.6 Interpretation der Ergebnisse und Ausblick</b>	<b>56</b>
<b>V ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>58</b>
<b>VI ANHANG</b>	<b>59-69</b>
<b>VI.1 Zusammenfassung (englisch)</b>	<b>59</b>
<b>VI.2 Liste verwendeter Abkürzungen</b>	<b>60</b>
<b>VI.3 Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>VI.4 Erklärung zur Durchführung der Dissertation</b>	<b>67</b>
<b>VI.5 Lebenslauf</b>	<b>68</b>
<b>VI.6 Danksagung</b>	<b>69</b>

# I Einleitung

## I.1 ARDS

Das ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME (ARDS) ist gekennzeichnet durch einen plötzlichen Krankheitsbeginn mit Lungenversagen, welches bei chirurgischen wie internistischen Patienten auftritt. Ausgelöst wird das ARDS durch eine unkontrollierte systemische Immunantwort, die auch die Aktivierung von alveolären Makrophagen und Granulozyten beinhaltet sowie lokal und systemisch wirkende Mediatoren, die zur Regulation der Makrophagen und Leukozyten benötigt werden.<sup>1</sup>

ARDS wurde erstmals 1967, damals noch als ADULT RESPIRATORY DISTRESS SYNDROM bezeichnet, von ASHBAUGH und Kollegen bei Patienten mit akuter Atemnot, therapierefraktärer Hypoxie, verminderter Lungencompliance sowie diffusen pulmonalen Infiltrationen beschrieben.<sup>2</sup> Das American-European Consensus Conference Committee<sup>3</sup> verabschiedete schließlich 1992 die heute gängigste Definition des ARDS und änderte die Bezeichnung „Adult“ in „Acute“, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass das ARDS in allen Altersstufen auftritt. Demnach definiert sich das ARDS folgendermaßen:

- akuter Krankheitsbeginn
- beidseits Infiltrationen auf Röntgenaufnahmen
- pulmonalarterieller Wedgedruck  $\leq 18$  mmHg bzw. fehlende Zeichen einer linksatrialen Hypertension
- schwere Hypoxämie mit  $\text{PaO}_2:\text{FiO}_2 \leq 200$  mmHg

Die klinisch prädisponierenden Faktoren zur Entwicklung eines ARDS werden in zwei Kategorien zusammengefasst: pulmonale (direkte) und extrapulmonale (indirekte) Verletzungen oder Erkrankungen.<sup>4</sup> In Tabelle 1 sind die wichtigsten zusammengefasst.

<b>Pulmonale Verletzung/Erkrankung</b>	<b>Extrapulmonale Verletzung/Erkrankung</b>
Pneumonie	Sepsis, septischer Schock
Inhalationstrauma	schwere Traumata
Aspiration	große chirurgische Eingriffe
Lungenkontusion	Massentransfusion
	akute Pankreatitis

***Tabelle 1: ARDS-prädisponierende Erkrankungen***

In der Pathogenese unterscheidet man 3 verschiedene Phasen (akut/exsudativ, proliferativ, fibrotisch), die fließend ineinander übergehen und deren Schwere und Verlauf stark variieren können.

In der *akuten* oder *exsudativen* Phase kommt es zu einer diffusen Schädigung, die gekennzeichnet ist durch Granulozyten, Makrophagen, Erythrozyten, hyaline Membranen und eiweißhaltigem Exsudat im Alveolarraum.<sup>5</sup> Ausgelöst wird dieser Vorgang durch eine Zunahme der Permeabilität der kapillären und alveolären Membranen.<sup>6</sup> Die Endothelzellen und Pneumozyten Typ I schwellen an, die Zell-Zell-Verbindungen zerreißen und die alveoläre Membran wird zerstört. Das Ausmaß des alveolären Epithelschadens ist ein wichtiger Marker für die Prognose und das Outcome.<sup>7</sup>

Die *proliferative* Phase beginnt meist nach 2-3 Wochen. Das geschädigte Alveolarepithel kann keine suffiziente Clearance der Alveolarflüssigkeit mehr sicherstellen<sup>8,9</sup> und es wird nicht mehr genügend Surfactant gebildet (Proliferation und Zerstörung der Pneumozyten Typ II), was zu Atelektasen und einem verschlechterten Gasaustausch führt.<sup>10</sup> Fibroblasten wandern durch Lücken in der alveolären Membran in den alveolären Raum und können dort durch Kollageneinlagerung fibrotisches Gewebe bilden. Schließlich kann ein massiver Verlust der Epithelbarriere auch zu einem septischen Schock führen, wenn eine bakterielle Pneumonie vorliegt.<sup>11</sup>

Nach 3-4 Wochen kann die *fibrotische* Phase erreicht werden, wobei Typ III Kollagen durch starres Typ I Kollagen ersetzt wird, was eine verminderte Compliance und erhöhte Resistance mit unflexiblem Lungengewebe bewirkt. Das Ausmaß der Fibrose korreliert dabei mit der Mortalität.<sup>12</sup>



Die Klinik zeichnet sich durch Dyspnoe, Hypoxie, pulmonale Infiltrationen und ggf. Pleuraergüsse aus. Aus diesem akuten Stadium kann sich dann über proliferative Prozesse ein chronisches Stadium entwickeln. Dabei kommt es durch Ödembildung, Fibrosierung und Zellproliferation zur zunehmenden Verdickung von Endothel, Epithel und Interstitium. Resultat ist eine ausgeprägte Hypoxie, vergrößerter alveolärer Totraum und eine verminderte pulmonale Compliance.<sup>4</sup> Durch Erhöhung des Lungengefäßwiderstandes und des pulmonalarteriellen Druckes kann sich zudem ein massives Cor pulmonale ausbilden.<sup>13</sup>

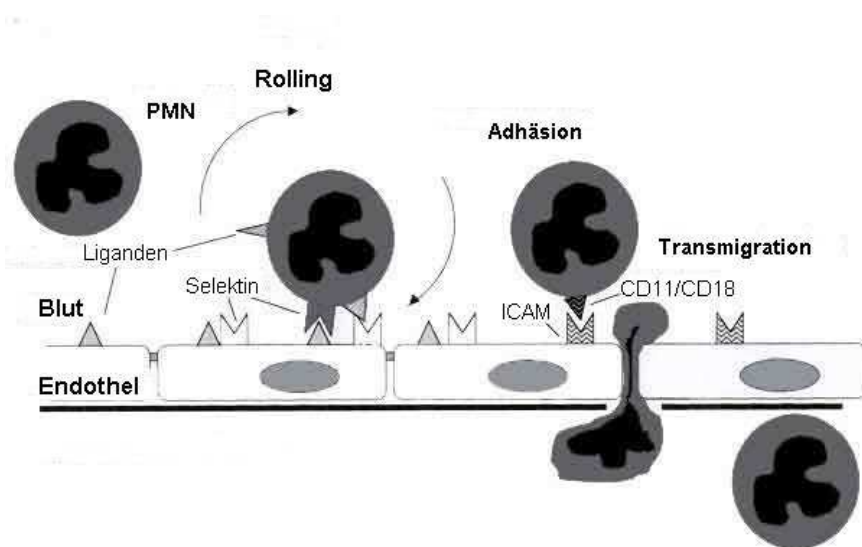
## **I.2 ARDS und Inflammation**

### **I.2.1 Rolle neutrophiler Granulozyten im ARDS**

Viele Studien konnten belegen, dass polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) in der Pathogenese des ARDS eine zentrale Rolle spielen. Sie sind die dominierende Zelllinie der Leukozyten im Alveolarraum und der Ödemflüssigkeit.<sup>14,15</sup> PMN haben wichtige Funktionen im unspezifischen Immunsystem und dienen primär der Mikrobenabwehr. Sie können glykolytisch Energie gewinnen und sind in der Lage, auch im sauerstoffarmem, entzündetem und schlecht durchblutetem Gewebe zu überleben. Sie bilden zum einen sauerstoffabhängig reaktive Sauerstoffspezies, welche die Zellstrukturen zerstören und Enzyme inaktivieren. Zum anderen werden sauerstoffunabhängig Granulakomponenten sezerniert. Durch Phagozytose und Phagosombildung werden über diese kooperativ ablaufenden Mechanismen Bakterien und Gewebetrümmer abgebaut.<sup>16</sup> Das fragile Gleichgewicht zwischen Nutzen und Schaden dieser granulozytären Eigenschaften spielt bei inflammatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Ist zum einen eine effiziente Abwehr von pathogenen Erregern essentiell, führt eine ungebremste und chronische Aktivierung von Granulozyten durch die oben beschriebenen Mechanismen zu Gewebeschäden. Hierbei spielen auch die von den Granulozyten gebildeten inflammatorischen Mediatoren eine wichtige Rolle.<sup>17</sup>

Während inflammatorischer Prozesse produzieren Alveolarmakrophagen in der geschädigten Lunge Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), -4, -6, -8 und -10 und Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ). Aktivierte PMN gelangen durch diese Zytokine getriggert und „versteift“ in das Kapillarbett der Lunge, wo sie adhärent werden und über die Endothelwand rollen. Dieser erste Schritt zur lockeren Anhaftung („Rolling“) wird durch Selektine erreicht, eine zu den Adhäsionsmolekülen gehörende Gruppe von Transmembranproteinen. Dabei korrespondiert

L-Selektin auf den neutrophilen Granulozyten und E-Selektin auf den Endothelzellen mit dem jeweils entsprechenden Liganden auf der Zielzelle.<sup>18</sup> Eine feste Adhäsion benötigt dann die Aktivierung von Integrinen, ebenfalls den Adhäsionsmolekülen zugehörige Glykoproteine. PMN präsentieren  $\beta_2$ -Integrin (CD11/CD18), dessen Ligand ICAM (intracellular adhesion molecule) von vielen körpereigenen Zellen (u.a. Endothel- und Bronchialepithelzellen) gebildet wird.<sup>19,47</sup> Nach diesem festen Zell-Zell-Kontakt durchdringen die PMN schließlich die Endothelwand und gelangen so entlang eines Konzentrationsgradienten von Chemokinen zum Ort der Entzündung („Transmigration“).<sup>20</sup> In Abbildung 1 ist dieser Vorgang schematisch zusammengefasst.



**Abbildung 1: Rolling, Adhäsion und Transmigration des Granulozyten**

## I.2.1.1 Granulozytäre Mechanismen der Inflammation

### I.2.1.1.1 Degranulierung

Neutrophile Granulozyten enthalten eine Vielzahl von antibakteriellen und zytotoxischen Substanzen, welche der Phagozytose dienen oder in den Extrazellularraum abgegeben werden können. Diese granulozytären Enzyme sind zytosolisch innerhalb geschlossener Kompartimente (Granula, sekretorische Vesikel) lokalisiert. Die Freisetzung dieser Granula und sekretorischen Vesikeln im Rahmen der Phago- und Exozytose spielt eine tragende Rolle bei fast allen Aufgaben und Funktionen der PMN - von der ersten Aktivierung bis hin zur Zerstörung phagozytierter Mikroben.<sup>21</sup> Aber auch die bei überschießenden inflammatorischen Prozessen zu beobachtende Zerstörung extrazellulärer Matrix sowie Nekrosen sind in diesem Zusammenhang zu nennen.<sup>22</sup> Zudem enthalten die Granula und Vesikel Membranproteine, welche während der Exozytose in die Zellmembran integriert werden und Interaktionen mit der Umgebung sowie benachbarten Zellen erlauben.<sup>23</sup> Während der Differenzierung zum reifen neutrophilen Granulozyten bilden sich die für diese Zellen typischen Granula aus. Basierend auf ihrem Auftreten im Rahmen der Zellreifung und dem Zeitpunkt ihrer Mobilisierung bei inflammatorischen Prozessen unterscheidet man drei Klassen von Granula und sekretorische Vesikel.

#### *Primäre oder azurophile Granula*

Sie treten bereits im Promyelozytenstadium auf, werden als letzte der verschiedenen Granula mobilisiert und enthalten in erster Linie Myeloperoxidase, die unter anderem die toxische Potenz des von der NADPH-Oxidase (Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase) gebildeten  $H_2O_2$  steigert.<sup>24</sup> Daneben finden sich weitere antimikrobielle und zytotoxische Peptide wie saure Hydrolasen (saure Phosphatase,  $\alpha$ -Mannosidase, N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase), bactericidal/permeability-increasing proteine (BPI) und neutrale Proteasen (Proteinase-3, Cathepsin G, Elastase), welche auch aktivierend auf Lymphozyten, Makrophagen und Thrombozyten wirken.<sup>25,26</sup> Ein anderer Hauptbestandteil primärer Granula sind Defensine. Diese kationischen Peptide besitzen ein breites antimikrobielles Wirkspektrum sowie chemotaktische Eigenschaften und scheinen bei der Pathogenese des ARDS eine wichtige Rolle zu spielen.<sup>27</sup>

### *Sekundäre oder spezifische Granula*

Sie entwickeln sich in einem späteren Stadium der Granulopoese, partizipieren an der Phago- und Exozytose mit der Freisetzung antimikrobieller Substanzen und werden schneller als die primären, jedoch nach den Gelatinase Granula rekrutiert.<sup>28</sup> Enzymatische Inhaltsstoffe sind unter anderem das Glykoprotein Lactoferrin, welches Bakterienwachstum durch Bindung von Eisen limitiert und Membranschäden mit konsekutiver Lyse verursacht<sup>29,30</sup> und die antimikrobiellen und chemotaktischen Peptide humanes Cathelicidinprotein-18 (hCAP-18) und Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL).<sup>19</sup>

### *Gelatinase Granula*

Sie erscheinen am Ende der Granulozytenreifung und enthalten überwiegend Gelatinase. Gelatinase ist ein in seiner Funktion der Kollagenase ähnelndes Matrix-degradierendes Enzym, womit Kollagen aus Basalmembranen und Bindegewebe zersetzt werden kann, um dem Granulozyten die Diapedese zu ermöglichen. Durch Exozytose dieser Granula werden auch Adhäsionsmoleküle in die Zellwand eingebracht welche Cytochrom b558, einen essentiellen Bestandteil der NADPH Oxidase, enthalten.<sup>31</sup>

### *Sekretorische Vesikel*

Sie werden durch eine breite Vielzahl inflammatorischer Stimuli wie z.B. das bakterielle Tripeptid n-formyl-L-Methionin-L-Leucin-L-Phenylalanin (fMLP), den Lipidmediator Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), TNF- $\alpha$  oder den Komplementfaktor C5a als Erste mobilisiert, denn sie sind besonders reich an Rezeptoren, versetzen den Granulozyten in einen aktivierten Zustand und ermöglichen eine feste Adhäsion mit aktiviertem vaskulärem Endothel.<sup>32,31</sup> Eine Übersicht der Rezeptoren bietet Tabelle 2.

	<b>Azurophile Granula</b>	<b>Spezifische Granula</b>	<b>Gelatinase Granula</b>	<b>sekretorische Vesikel</b>
<b>Matrix</b>	$\alpha$ 1-Antitrypsin	hCAP-18	Acetyltransferase	Plasmaproteine
	Cathepsine	Kollagenase	Gelatinase	
	Defensine	Lactoferrin	Lysozyme	
	Elastase	Lysozyme		
	Lysozyme	NGAL		
	Myeloperoxidase			
	Saure Phosphatase			
	$\alpha$ -Mannosidase			
	N-acetyl- $\beta$ - Glucosaminidase			
	BPI			
<b>Membran</b>	CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Alkalische
	CD68	Cytochrom	Cytochrom b558	Phosphatase
		fMLP-Rezeptor	fMLP-Rezeptor	CD10
		TNF-Rezeptor		CD11b/CD18
				CD13
				CD14
				CD16
				CD45
				Cytochrome
				fMLP-Rezeptor
			Leukolysin	

**Tabelle 2: Inhalt neutrophiler Granula und sekretorischer Vesikel. Modifiziert nach 31.**

### *Metalloproteasen*

Kollagenase (spezifische Granula), Gelatinase (Gelatinase Granula) und Leukolysin (spezifische sowie Gelatinase Granula und sekretorische Vesikel) spielen eine zentrale Rolle bei der Auflösung extrazellulärer Matrix wie Kollagen, Fibronectin, Laminin und Gelatin. Sie ermöglichen zudem Diapedese und Migration. Man vermutet, dass ein Ungleichgewicht zwischen Metalloproteasen und deren Inhibitoren ein wichtiges Merkmal in der Pathogenese von ARDS darstellt.<sup>33</sup>

#### **I.2.1.1.2 Respiratory Burst und reaktive Sauerstoffspezies**

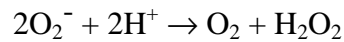
Schon 1932 wurde die Beobachtung gemacht, dass während der Phagozytose der Sauerstoffverbrauch des Granulozyten auf das 50 bis 100fache ansteigt.<sup>34</sup> Dieser als „respiratory burst“ bezeichnete Vorgang mündet in der stufenweisen Entwicklung einer Reihe von reaktiven Sauerstoffspezies. Katalysierendes Enzym dieses Prozesses ist die NADPH-Oxidase, welche einen Multienzymkomplex darstellt. Sie besteht aus 2 membrangebundenen (gp91<sup>PHOX</sup> und p22<sup>PHOX</sup>) und 3 zytosolischen (p67<sup>PHOX</sup>, p47<sup>PHOX</sup> und p40<sup>PHOX</sup>) Komponenten sowie einem niedermolekularen G-Protein. Den katalytischen Kern stellen dabei die membrangebundenen Proteine dar, welche überwiegend in spezifischen Granula gespeichert sind und als Flavocytochrom *b*<sub>558</sub> bezeichnet werden. Erst bei Aktivierung des Granulozyten durch einen adäquaten Stimulus werden die zuvor inaktiven Komponenten kombiniert. Unter Einbeziehung kontraktile Elemente des Zytoskeletts sowie Proteinkinase C-abhängiger Phosphorylierung werden die zytosolischen Proteine an die Plasmamembran transloziert und mit den membranständigen Komponenten verschaltet.<sup>35</sup>

Die NADPH-Oxidase produziert grosse Mengen von Superoxidanionen aus NADPH und Sauerstoff:



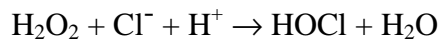
$\text{O}_2^-$  ist ein Substrat mit hoher Reduktionsfähigkeit aber sehr geringer Oxidationskapazität und dient als Vorstufe weiterer reaktiver Sauerstoffspezies. Durch spontane Reduktion oder durch Superoxid-Dismutase katalysierte Dismutation wird aus dem freien Radikal Superoxid ( $\text{O}_2^-$ )

das sehr viel stabilere Hydrogenperoxid, welches aufgrund seiner fehlenden Polarität ähnlich wie Wasser in Zellen eindringen kann.



Aus Hydrogenperoxid wiederum entsteht durch Oxidation von Metallsalzen ( $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$ ) das hoch reaktive Hydroxylradikal  $\cdot\text{OH}$ . Einmal generiert werden Moleküle jeder Art attackiert.

Katalysiert durch Myeloperoxidase aus den primären Granula entsteht zudem aus Chloridionen und Hydrogenperoxid das potente Oxidans Hypochlorsäure.



Diese Reaktion ist nur durch gleichzeitige Anwesenheit von Sauerstoffradikalen und freigesetzten Granulaenzymen möglich – ein Beispiel, welches die synergistische Wirkung beider Systeme verdeutlicht.<sup>36,37</sup>

Eine Übersicht der reaktiven Sauerstoffspezies bietet Tabelle 3.

freie Radikale	Nichtradikale
$\text{O}_2^{\cdot-}$ Superoxide	$\text{H}_2\text{O}_2$ Hydrogenperoxid
$\cdot\text{OH}$ Hydroxyl	$\text{HOCl}$ Hypochlorsäure
$\text{RO}_2^{\cdot}$ Peroxyl	$\text{O}_3$ Ozon
$\text{RO}^{\cdot}$ Alkoxy	$\text{ROOH}$ Hydroperoxid
$\text{HO}_2^{\cdot}$ Hydroperoxyl	

**Tabelle 3: Reaktive Sauerstoffspezies. Modifiziert nach 35.**

Die entstandenen reaktiven Verbindungen entfalten ihre destruktive Wirkung über unterschiedliche Mechanismen: Einerseits reagieren sie direkt mit Proteinen, Nucleinsäuren oder Membranlipiden, andererseits inaktivieren sie endogene Proteaseinhibitoren (wie  $\alpha 1$ -Antitrypsin) und ermöglichen somit eine maximale Wirkung granulozytärer Proteasen.

## I.2.2 Rolle der Pulmonalepithelien im ARDS

Das respiratorische Epithel unterhält eine effektive antimikrobielle Umgebung, um der Besiedlung von Krankheitserregern entgegenzuwirken. Die Epithelzellen reagieren in Anwesenheit von Mikroben zum einen mit einer verstärkten Produktion von antimikrobiellen Substanzen (Peptide und Proteine) und zum anderen wird ein Signalnetzwerk gestartet, welches phagozytierende Zellen rekrutiert. Inflammatorische Mediatoren dieser rekrutierten Zellen sowie von den Epithelzellen selber gebildete Immunmodulatoren unterhalten diesen Mechanismus. Zudem werden inhalierte Partikel und somit auch Mikroben durch den koordinierten Zilienschlag und Hustenstöße mit dem produzierten Bronchialschleim aus dem Bronchialsystem befördert.<sup>40</sup>

### I.2.2.1 Antimikrobielle Peptide und Proteine

Im Bronchialsekret lässt sich eine ganze Reihe von Proteinen finden, die sowohl direkt antimikrobielle Eigenschaften besitzen als auch eine Mediatorfunktion ausüben und dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden:

Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor (SLPI), Lysozym und Lactoferrin sind antibiotische Peptide mit einem breiten Wirkspektrum, wobei SLPI auch ein potenter Elastase-Inhibitor ist.<sup>38</sup>

Die Defensine sind kleine kationische Peptide, die man in 2 Klassen aufteilt:  $\alpha$ -Defensine sind überwiegend in den primären Granula der PMN lokalisiert während  $\beta$ -Defensine unter anderem von Bronchialepithelzellen gebildet werden. Sie weisen starke Aktivität gegenüber gram-positiven wie -negativen Bakterien, Pilzen, Mykobakterien sowie Viren auf.<sup>39</sup> Bisher konnten als Transkriptionsstimuli Mikroorganismen, Lipopolysaccharide (LPS) und TNF sowie IL-1 $\alpha,\beta$  identifiziert werden und man konnte eine generalisierte Steigerung der Produktion von  $\beta$ -Defensin 2 bei Patienten mit bakterieller Pneumonie verzeichnen.<sup>40,41</sup> Außerdem stellen die  $\beta$ -Defensine als Ligand für den Chemokinrezeptor CCR6 auf dendritischen und T-Zellen eine Verbindung zwischen natürlichem und erworbenem Immunsystem her.<sup>42</sup>

Das ebenfalls kationische Cathelicidin (LL37/hCAP-18) besitzt eine Breitbandspektrum-Wirkung und die Precursorform wird zum einen von Bronchialepithelzellen und zum anderen von einer Reihe weiterer Zellen wie PMN, Monozyten, T- und B-Zellen gebildet. Neben der



antibiotischen Wirkung ist Cathelicidin (genauso wie die Defensine) in der Lage, LPS zu binden und die biologischen Aktivitäten dieses Endotoxins zu inaktivieren.<sup>43</sup>

Weitere potente antibakterielle Agentien sind Sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub>, Peroxidase, Aminopeptidase sowie Stickstoffmonoxid (NO).<sup>40</sup>

### **I.2.2.2 Immunantwort der pulmonalen Epithelzellen**

Im Rahmen einer inflammatorischen Immunantwort und zur Rekrutierung weiterer Leukozyten spielen einerseits die antimikrobiellen Peptide selber aber auch die Freisetzung von Zytokinen eine wichtige Rolle. Außerdem exprimieren auch Bronchialepithelzellen intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1), die sie auf entsprechende Aktivierung (TNF, IL-4) präsentieren, um eine adäquate Zellanhaftung der PMN zu ermöglichen.<sup>44</sup> Die  $\beta$ -Defensine locken neben dendritischen Zellen und T-Zellen auch Monozyten an<sup>45</sup> und Cathelicidin über den spezifischen Rezeptor FPRL1 (formyl peptide receptor-like 1) zusätzlich PMN, welche ihrerseits mit Zytokinen (z.B. IL-8) und  $\alpha$ -Defensinen die Immunreaktion aufrechterhalten.<sup>46</sup> Daneben konnten weitere Zytokine identifiziert werden, die von den Bronchialepithelzellen gebildet werden: unter anderem Interleukine (IL-1, -5, -6, -8), granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), Interferon- $\gamma$ , Fibronectin und Endothelin.<sup>40,47</sup> Neben diesen proinflammatorischen Substanzen können Defensine aber auch die Sekretion antiinflammatorischer Agentien wie IL-10 oder SLPI induzieren.<sup>43</sup> Alveolarepithelzellen produzieren im Rahmen inflammatorischer Reaktionen auf entsprechende Reize (TNF, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ebenfalls Thromboxan A<sub>2</sub>, Prostaglandine (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), IL-8 und IL-6.<sup>48,49</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Mediatoren untersucht, die eine regulatorische Funktion auf PMN ausüben. Im Folgenden werden diese Mediatoren detaillierter betrachtet.

### **I.2.2.3 Antiinflammatorische Mediatoren pulmonaler Epithelien**

#### **I.2.2.3.1 Adenosin**

Adenosin ist ein endogenes Nukleosid aus der Purinbase Adenin und Ribose und wird von Zellen im Rahmen physiologischer Stoffwechselfvorgänge gebildet. Während Ischämie oder Hypoxie wird der Abbau von ATP gesteigert und es kommt lokal zu Konzentrationen von Adenosin, die im Mikromolarbereich liegen.<sup>50</sup> Von den Bronchialepithelzellen an der Zellmembran gebildet, reguliert Adenosin unter anderem Epithelfunktionen, die der mukoziliaren Clearance zugeschrieben werden.<sup>51</sup> Adenosin wirkt vasodilatierend, vagotrop und findet als Antiarrhythmikum Anwendung. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass im Rahmen von Ischämien und Reperfusionen Adenosin protektive Wirkung auf Kardiomyozyten hat. Dies wird durch die reduzierte Abgabe von Noradrenalin sowie Endothelin, die Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems und durch Induktion von Kollateralkreisläufen erreicht.<sup>52</sup> Die inhibitorische Wirkung an PMN entfaltet Adenosin über Adenosin A2- und A3-Rezeptoren, die sowohl respiratory burst<sup>53</sup> und Degranulierung<sup>54</sup> als auch Leukotriensynthese und Arachidonsäurefreisetzung<sup>55</sup> beeinflussen. Hinzu kommt die verminderte Endothelzelladhäsion und Expression von Adhäsionsmolekülen sowie eine reduzierte TNF-Produktion.<sup>50</sup> Auch über die Arachidonkaskade kann Adenosin als antiinflammatorisches Agens wirken, denn eine ungenügende Verfügbarkeit von Arachidonsäure (AA) limitiert die Fähigkeit der PMN zur Eicosanoidsynthese, wozu Adenosin durch Interaktion über A2-Rezeptoren (Phospholipase A2) in der Lage ist.

Um die Wirkung von Adenosin zu blockieren, wurde Theophyllin verwendet, ein nichtselektiver Adenosinrezeptor-Antagonist.

### I.2.2.3.2 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein löslicher, endogener Gas-Mediator mit fundamentaler Bedeutung bei der Regulation von Gefäßtonus, der Steuerung von Immunantwort, inflammatorischen Prozessen und Blutgerinnung sowie der Neurotransmission. Außerdem reguliert Stickstoffmonoxid die funktionale Aktivität, Wachstum und Tod von vielen am Immungeschehen beteiligten Zellen wie Makrophagen, T-Lymphozyten, Antigen-präsentierenden Zellen, Mastzellen, natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten. NO wird von einer Familie von Stickstoffoxidsynthasen (nitric oxide synthase (NOS)) gebildet, welche die Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO katalysieren. Man unterscheidet die zwei konstitutiven Formen nNOS (neuronale NOS) und eNOS (endotheliale NOS) sowie die induzierbare Form iNOS, deren pulmonale Hauptquelle die Bronchialepithelzellen bilden. Dabei ist die Aktivierung der konstitutiven Enzyme  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängig und erfolgt über elektrische Impulse oder ist Rezeptor-gekoppelt.<sup>56</sup> Die induzierbare Form kann im Rahmen einer Entzündung von einer Vielzahl von Zellen Calcium-unabhängig exprimiert werden. Die Aktivierung erfolgt hierbei überwiegend durch proinflammatorische Zytokine wie TNF, Interferon- $\gamma$ , GM-CSF und IL-1 $\beta$ .<sup>57,58</sup> Durch die fehlende Abhängigkeit von intrazellulärem Calcium wird sichergestellt, dass, wenn einmal induziert, iNOS große Mengen von NO bereitstellen kann während gleichzeitig NO von den Zellen rasch abgebaut wird. Dadurch wird erreicht, dass bei Säugetieren des inflammatorischen Stimulus die NO-Produktion rasch terminiert wird.<sup>59</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde N<sup>G</sup>-Methyl-L-Arginin (L-NMMA) als kompetitiver NO-Inhibitor verwendet. L-NMMA fungiert als „falsches Substrat“ und ist ein am terminalen Guanidin-Stickstoff substituiertes Derivat des L-Arginin ohne NO-Synthase Isoformselektivität.

### I.2.2.3.3 Eicosanoide

Zu den Eicosanoiden rechnet man die Gruppen der Leukotriene, Prostaglandine, Thromboxane und Lipoxine. Eicosanoide sind primär proinflammatorische Lipidmediatoren (mit Ausnahme der Lipoxine und teilweise der Prostaglandine), die neben der Entstehung von Entzündungsreaktionen mit den Kardinalzeichen Hitze, Rötung, Schwellung, Schmerz und Funktionsverlust<sup>60</sup> auch eine wichtige Rolle bei der Regulation von Gefäßweite und

-permeabilität, Schmerzentstehung und Blutstillung spielen. Gebildet werden die Eicosanoide in der Arachidonsäure-Kaskade aus der Ausgangssubstanz Arachidonsäure, eine 4-fach ungesättigte C20-Fettsäure, die in Membranlipiden in veresterter Form vorliegt. Die Freisetzung dieses Eicosanoid-Precursors wird durch Calcium-abhängige Aktivierung einer oder mehrerer Phospholipase A<sub>2</sub>-Subtypen reguliert. Auch über Zell-Zell-Kontakte zu Nachbarzellen können Zwischenprodukte der AA weitergegeben werden. In der Biosynthese der Eicosanoide kann freie AA durch zwei unterschiedliche Oxygenase-Systeme zu biologisch aktiven Mediatoren verstoffwechselt werden. Durch Aktivierung des Lipoxygenase-Metabolismus werden Leukotriene und Lipoxine synthetisiert, während der Cyclooxygenase-Schenkel zur Bildung von Prostaglandinen, Thromboxanen und Prostacyclinen führt.<sup>61</sup> Eine vereinfachte Darstellung des Arachidonsäuremetabolismus bietet Abbildung 2.

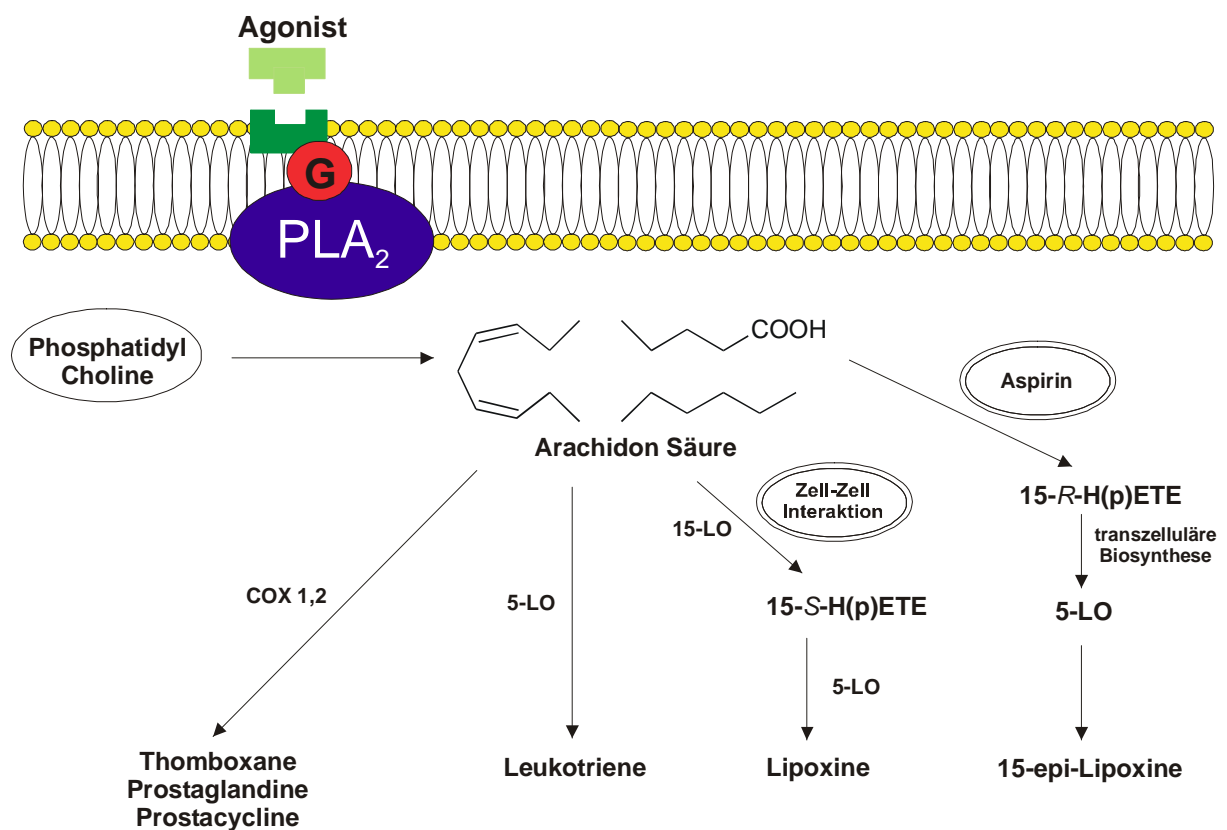


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Arachidonsäuremetabolismus

### *Lipoxine*

Lipoxine sind Trihydroxytetraene enthaltende Eicosanoide, die innerhalb des vaskulären Lumens während Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen und auf Schleimhautoberflächen während Leukozyten-Epithelzell-Interaktionen generiert werden. Der Zell-Zell-Kontakt, der bei entzündlichen Prozessen zwischen Thrombozyten und Epithelzellen mit PMN entsteht, spielt eine entscheidende Rolle, um die Biosynthese der Lipoxine zu steigern.<sup>62</sup> Lipoxine werden als Reaktion auf entsprechende Stimuli hin auf unterschiedlichen Wegen sehr schnell generiert, wobei initial zwei Lipoxygenasen beteiligt sind.

- 15-Lipoxygenase initiiertes Syntheseweg

Zunächst wird molekularer Sauerstoff durch die 15-Lipoxygenase (15-LO) in C15-Position der AA eingefügt und es entsteht 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure (15-HPETE), die von leukozytärer 5-Lipoxygenase (5-LO) zum 5,6-Epoxytetraen konvertiert wird. Dieses instabile Zwischenprodukt wird schließlich von Epoxidhydrolasen zu Lipoxin B<sub>4</sub> (LXB<sub>4</sub>) oder Lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) umgebaut.<sup>63</sup>

- 5-Lipoxygenase initiiertes Syntheseweg

Thrombozyten sind bei Adhäsion mit PMN in der Lage, Leukotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), gebildet von granulozytärer 5-LO, mit thrombozytärer 12-LO in LXA<sub>4</sub> oder LXB<sub>4</sub> zu konvertieren. 12-LO fungiert in Thrombozyten also wie eine „Lipoxinsynthase“.<sup>64</sup> Epithelzellen und im Besonderen die der Trachea wandeln mit Hilfe der 15-LO das von PMN freigesetzte LTA<sub>4</sub> in Lipoxine um.<sup>65</sup>

- Aspirin getriggerte Lipoxine (ATLS)

Cyclooxygenase 2, wenn von Aspirin in Epithel- und Endothelzellen acetyliert, ist enzymatisch dahingehend noch aktiv, dass AA zu 15*R*-HETE (C15 Alkohol in *R*-Konfiguration) konvertiert wird. Bei Zell-Zell-Kontakt wird das epithelial freigesetzte 15*R*-HETE von neutrophiler 5-LO zu 15-epi-LXA<sub>4</sub> oder 15-epi-LXB<sub>4</sub> konvertiert, die beide ähnliche antiinflammatorische Eigenschaften besitzen wie native Lipoxine allerdings eine größere Potenz und Effizienz.<sup>66</sup>

Lipoxine wirken an den Leukozyten über besondere Lipoxinrezeptoren während die antiinflammatorische Potenz durch die speziellen Tetraene enthaltenden Bestandteile bewirkt wird, die den Granulozyten als „Stoppsignal“ dienen. Lipoxine schwächen die chemotaktische

Wirkung von LTB<sub>4</sub> ab und verringern die neutrophile Zelladhäsion sowie Migration. LXA<sub>4</sub> inhibiert zudem die Expression von IL-1 $\beta$ , -8 und TNF- $\alpha$  und wirkt als Vasodilatator.<sup>63,67</sup>

### *Cyclooxygenaseprodukte der Arachidonsäure*

Bei der Prostaglandinsynthese wird zunächst AA durch die Cyclooxygenase (COX) zu PGG<sub>2</sub> konvertiert, welches seinerseits zum hoch instabilen PGH<sub>2</sub> und rasch weiter zu anderen Prostaglandinen, Prostacyclinen und Thromboxanen katalysiert wird.<sup>68</sup> Die Cyclooxygenase liegt in zwei Isoformen vor: COX 1 wird konstitutiv von vielen Geweben gebildet und spielt bei physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle, während die induzierbare COX 2 bei Entzündungsvorgängen verstärkt exprimiert wird. Aber nicht nur bei der Initiation von Entzündungsvorgängen sondern auch bei deren Auflösung sind Stoffwechselprodukte der Cyclooxygenase beteiligt. So führt Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) dazu, dass PMN die Eicosanoidbiosynthese von proinflammatorisch auf antiinflammatorisch „umprogrammieren“, nämlich von überwiegend Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) und 5-LO-getriggert auf Lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) und 15-LO-getriggert, was als Stoppmechanismus für die Infiltration der neutrophilen Granulozyten wirkt.<sup>69</sup> Direkt antiinflammatorische Funktionen scheinen weitere Prostaglandine zu haben, deren Inhibition zu einer signifikanten Exazerbation von Entzündungsvorgängen führt. Dazu zählen Prostaglandin D<sub>2</sub> und 15deoxy $\Delta$ <sup>12-14</sup>Prostaglandin J<sub>2</sub>.<sup>70</sup>

### **I.3 Regulation der granulozytären Aktivität durch Zell-Zell-Interaktionen**

Beim Ablauf inflammatorischer Reaktionen ist eine schnelle Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom in den extravaskulären Raum essentiell. PMN sind hierbei in vielen akut und chronisch inflammatorischen Prozessen die dominierenden und am frühesten infiltrierenden Zellen. Granulozytäre inflammatorische Reaktionen bestimmen dabei in hohem Maße die Regulation der Entzündungsreaktion. Dennoch sind nahezu alle inflammatorischen Abläufe multizelluläre und komplexe Vorgänge, die spezifische Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen im vaskulären und extravaskulären Raum benötigen. Neutrophile Granulozyten kommunizieren im Rahmen entzündlicher Prozesse daher mit vielen unterschiedlichen Zellpopulationen:

### I.3.1 Thrombozyten

Thrombozyten nehmen auf mehreren Ebenen Einfluss auf die Funktion und Motilität von PMN. Aktivierte Thrombozyten unterstützen das Rolling und die feste Adhäsion der Granulozyten über P-Selektin- und CD11b/CD18-Aktivität ( $\beta_2$ -Integrin) und potenzieren die IgG-vermittelte Phagozytose und die damit verbundene Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies.<sup>71,72</sup> Zudem potenzieren Thrombozyten sowohl die zufällige wie auch die chemotaktisch getriggerte Migration von PMN und amplifizieren dabei die Polymerisation von Aktin-Filamenten und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel. Beides sind wichtige Faktoren bezüglich der Lokomotion des Granulozyten.<sup>73</sup>

### I.3.2 Lymphozyten

Ein direkter Zellkontakt mit stimulierten T-Zellen bewirkt zum einen eine gesteigerte Aktivierung neutrophiler Granulozyten mit fMLP und zum anderen wird eine gesteigerte Aktivität des respiratory burst (reaktive Sauerstoffspezies) induziert. Auch hier ist der Mechanismus dieser Einflussnahme an CD18 auf der Zelloberfläche gekoppelt, sowie an einen oder mehrere bisher noch nicht identifizierte HDL(high-density lipoprotein)-Liganden.<sup>74</sup>

### I.3.3 Endothelzellen

Die Aktivierung von PMN führt zur Formation von signifikanten Mengen von Leukotrien  $\text{C}_4$  ( $\text{LTC}_4$ ). Dies geschieht über den Transfer des instabilen Epoxid Leukotrien  $\text{A}_4$  ( $\text{LTA}_4$ ) von PMN auf Zellen, die  $\text{LTC}_4$ -Synthase-Aktivität besitzen, wie zum Beispiel Endothelzellen. Diesen Vorgang beschreibt man auch als „transzelluläre Synthese von Cysteinyl-Leukotrienen“ und kann zu Vasokonstriktion und perivaskulären Ödemen führen.<sup>75</sup> Aktiviertes Endothel verfügt zudem über die Fähigkeit die granulozytäre Apoptose zu hemmen und kann auf diese Weise PMN-mediierte Gewebe- und Organdestruktion verstärken.<sup>76,77</sup>

## **I.4 Fragestellung**

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welchen Einfluss üben Bronchial- und Alveolarepithelzellen auf die Aktivierung der Sauerstoffradikalfreisetzung und die Degranulierung von neutrophilen Granulozyten aus?
2. Ist der Einfluss von Bronchial- und Alveolarepithelzellen auf neutrophile Granulozyten abhängig von einem direkten Zell-Zell-Kontakt?
3. Welche Rolle spielt eine feste Zelladhäsion über intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM)?
4. Kann der regulatorische Effekt der Bronchial- und Alveolarepithelzellen durch pharmakologische Inhibition epithelabhängiger Mediatoren modifiziert werden?
5. Unterscheiden sich Bronchial- und Alveolarepithelzellen im Einfluss auf neutrophile Granulozyten?



## II Material und Methodik

### II.1 Materialien

#### II.1.1 Epithelzellen sowie Materialien und Lösungen für die Inkubation und das Passagieren

- Bronchialepithelzellen BEAS-2B von ATCC (American Type Culture Collection) CRL-9609 (ATCC, Manassas, USA)
- Keratinocyte-SFM (serumfreies Keratinocytenmedium) (Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland)
- Alveolarepithelzellen A549 von ATCC (American Type Culture Collection) CCL-185 (ATCC, Manassas, USA)
- Dulbecco's MEM NUT mix F-12 (DMEM/F12) (Gibco, Eggenstein, Deutschland)
- Trypsin-EDTA (Gibco, Eggenstein, Deutschland)
- Fetales Kälberserum (FCS) (Boehringer, Mannheim, Deutschland)

#### II.1.2 Kulturgefäße

- Multischalen 12 Vertiefungen (Nunc, Kamstrup, Dänemark)
- T-25-Zellkulturflaschen (Nunc, Kamstrup, Dänemark)
- Polypropylene-Röhrchen à 12,5 und 50 ml (Falcon, Deutschland)

#### II.1.3 Materialien und Lösungen für die Zellisolation und Inkubation der PMN

- Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- PBS -/- (sine  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ )
  - 100 ml PBS 10x (sine  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
  - + 900 ml aqua destillata (aqua dest.)
  - + 1n NaOH ad pH 7,4
- PBS +/+ (cum  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ )
  - 100 ml PBS 10x (cum  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

- + 900 ml aqua dest.
- + 1n NaOH ad pH 7,4
- Polyvinylalkohol (PVA)
  - 1000 ml 0,9% NaCl (Pharmacia und Upjohn, Nürnberg, Deutschland)
  - + 10 g PVA (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- aqua ad iniectabilia (Pharmacia und Upjohn, Nürnberg, Deutschland)
- HH<sup>+/+</sup> (Hanks/Hepes-Puffer mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>)

#### II.1.4 Materialien und Lösungen für die Elastasemessung

- Substratlösung:
  - Chromogenes Substrat (S-2484) (KabiVitrum, Erlangen, Deutschland)
  - Ansatz: 25 mg Trockensubstanz + 7 ml DMSO (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Messpuffer: 100 mmol/l Tris-HCl, 960 mmol/l NaCl, pH 8,3
  - 60 ml aqua dest.
  - + 1,21 g Tris
  - + 5,62 g NaCl
  - + 1 M HCl ad pH 8,3
  - mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen
- Verdünnungspuffer: 0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,5 mit 0,1% Tween 20
  - 60 ml aqua dest.
  - + 1,2 ml Essigsäure 98 %
  - + 1 M NaOH ad pH 5,5
  - + 1 g Tween 20
  - mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen

#### II.1.5 Experimentelle Agentien und Pharmaka

- A23187 (Calciumionophor) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Adenosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Adenosin-Desaminase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Acetylsalicylsäure (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)

- anti-ICAM (muriner monoklonaler Antikörper gegen ICAM-1) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Cytochrom C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Daltroban (Thromboxan-Rezeptorantagonist) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- EDTA (Ethyldiamnitetraessigsäure-Dinatrium-Dihydrat) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- fMLP (Tripeptid) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Indometacin (COX-Inhibitor) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- L-NMMA (NO-Synthase-Inhibitor) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- MK886 (5-Lipoxygenase-Inhibitor) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Superoxiddismutase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Theophyllin (Adenosin-Rezeptorantagonist) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Trypan-Blau (Boehringer, Mannheim, Deutschland)
- Zaprinast (Inhibitor der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase 5) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

## II.2 Methodik

### II.2.1 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

Humane neutrophile Granulozyten wurden aus peripherem venösem Blut nach der Methode von BOYUM<sup>78</sup> durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten gewonnen. Die Isolation erfolgte standardmäßig unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur (20-25°C). Die Isolationsdauer betrug je nach verwendeter Vollblutmenge 1,5 bis 2 Stunden.

#### *Blutentnahme*

Die Isolation humaner PMN erfolgte aus EDTA-antikoaguliertem venösem Blut von gesunden Spendern, deren Durchschnittsalter bei 25 Jahren lag. Durch Punktion einer peripheren Vene in der Armbeuge mit einer Kanüle der Größe 19G erfolgte die Blutgewinnung. Das Blut wurde

in eine zuvor mit EDTA gefüllten Spritze aspiriert, wobei die Endkonzentration des EDTA hierin 0,125 % betrug.

### *Ficoll-Gradient*

Das Spenderblut wurde dann 1:2 mit PBS -/- verdünnt und 35 ml dieses Gemisches vorsichtig mit einer sterilen 50 ml Polypropylene-Pipette auf 15 ml Ficoll-Lösung, die zuvor in 50 ml-fassende sterile Polypropylene-Röhrchen vorgelegt worden war, aufgeschichtet.

Danach erfolgte eine Zentrifugationsperiode von 35 Minuten bei 400 x g. Durch diese Zentrifugation über den Ficoll-Gradienten bewirkt man eine Auftrennung von thrombozytenreichem Plasma, mononukleären Zellen (Mono- und Lymphozyten) und Granulo- und Erythrozyten. Die beiden letzten Zellpopulationen befanden sich nach dem Zentrifugieren in einer gemeinsamen Bande am Boden des Röhrchens. Nach Absaugen des Plasmas und der mononukleären Zellen erfolgte die Abtrennung der Erythrozyten von den PMN:

Zunächst wurde die Bande mit 10%igem Polyvinylalkohol in NaCl gemischt (Verhältnis 1:3) und 20 Minuten bei Raumtemperatur zur Sedimentation der Erythrozyten ruhen gelassen. Danach wurde der PMN-reiche Überstand mit einer Pipette abgenommen, in frische Röhrchen überpipettiert und bei 150 x g 10 Minuten zentrifugiert. Die Entfernung verbleibender Erythrozyten erfolgte durch hypotone Lyse. Dazu wurden die Zellen in 18 ml aqua dest. resuspendiert und nach einer Einwirkzeit von 20 Sekunden wurde die Lyse durch Zusatz von 2 ml 10-fachem PBS-Konzentrat beendet.

Zur vollständigen Reinigung der PMN von Ficoll-Rückständen schlossen sich zwei Waschschrte in PBS -/- (150 x g, 10 Minuten) an.

### *Zellzählung, Identifizierung und Vitalität*

Zwischen den beiden Waschschrten erfolgte die Quantifizierung der Zellen durch lichtmikroskopische Zählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bei 400-facher Vergrößerung. Durchschnittlich ließen sich aus 50 ml Blut ca.  $10 \times 10^7$  PMN isolieren.

Die Reinheit der isolierten Granulozyten wurde in regelmäßigen Abständen mittels Differentialblutbildern kontrolliert, dabei ergab sich ein PMN-Anteil von 97 %. Mono- und Lymphozyten waren mit jeweils 1 % vertreten, die restlichen Zellen wurden als eosinophile und basophile Granulozyten identifiziert.

Die Zellvitalität wurde mit Hilfe der Trypan-Blau-Ausschluss-Methode und der LDH-Freisetzung überprüft, wobei 98 % der PMN am Ende der Isolation vital waren. Die spontane

LDH-Freisetzung der PMN wurde auf die durch das Bienengift Mellitin hervorgerufene absolute Enzymfreisetzung bezogen und lag immer unter 3 %.

## **II.2.2 Erfassung granulozytärer Funktionsparameter**

### **II.2.2.1 Degranulierung**

#### *Prinzip*

Das Auftreten von Inhaltsstoffen der verschiedenen sekretorischen Kompartimente des Granulozyten im Zellüberstand gilt als Indikator einer abgelaufenen Degranulationsreaktion. Das Ausmaß der Degranulierung wurde anhand der Freisetzung des proteolytischen Enzyms Elastase in den Zellüberstand quantifiziert. Die Enzymaktivität wurde kinetisch über die Entstehung eines photometrisch detektierbaren Reaktionsproduktes erfasst, dabei kam die Methode von KRAMPS zum Einsatz.<sup>79</sup>

#### *Durchführung*

Als Maß für die Elastaseaktivität wurde die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme bei 405 nm herangezogen mit L-pyroglutamyl-L-propyl-L-valine-p-nitro-anilide als Substrat. Zur Durchführung dieses Essays wurden zunächst 200 µl Messpuffer und 100 µl Verdünnungspuffer in eine Küvette vorgelegt und dieser Ansatz dann mit 100 µl Zellüberstand versetzt. Nach dem Starten der Reaktion mit 200 µl Substrat, wurde die Extinktionszunahme bei 405 nm im Uvikon-Photometer kontinuierlich über einen Zeitraum von 3 Minuten registriert. Der Substratumsatz wurde standardmäßig bei 37°C gemessen und ist in U/l angegeben.

### **II.2.2.2 Respiratorischer Burst**

#### *Prinzip*

Die Aktivierung des respiratory burst wurde über Messung des primären Reaktionsproduktes der granulozytären NADPH-Oxidase, dem Superoxidanion, quantifiziert. Dazu wurde die Methode von COHEN<sup>80</sup> herangezogen, wonach die Superoxid-induzierte Reduktion von Cytochrom C photometrisch erfasst wurde. Den Versuchsansätzen wird vor der Stimulation Cytochrom C zugesetzt und gleichzeitig den Kontrollansätzen zusätzlich das Enzym

Superoxiddismutase, welches selektiv die O<sub>2</sub>-abhängige Cytochrom-Reduktion hemmt. Die Menge an Superoxidanion lässt sich so aus der Differenz der Cytochrom-C-Reduktion der beiden Ansätze bestimmen.

#### *Durchführung*

Alle Proben wurden paarweise angesetzt und enthielten 75 µM Cytochrom C in je 100 µl, wobei jeweils einem der Ansätze 10 µg/ml Superoxiddismutase zugesetzt wurde. Die Stimulation erfolgte bei 37°C für 10 Minuten im Wasserbad und wurde anschließend durch Kühlung auf Eis und Zentrifugation bei 4°C (1200 x g; 4 min) beendet. Die Zellüberstände wurden photometrisch bei 546 nm (Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom C) analysiert, wobei jeweils die Extinktion gegen den SOD-enhaltenden Parallelansatz gemessen wurde.

#### **II.2.2.3 Statistische Auswertung**

Alle erhobenen Daten sind als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (sem) angegeben. Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels Varianzanalyse (oneway-ANOVA) und anschließendem Tukey's honestly significant difference Test. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % entspricht.

#### **II.2.3 Kultivierung der Epithelzellen**

Die Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und 37°C. Ebenfalls unter sterilen Bedingungen und unter laminarem Flow, erfolgten der Wechsel der Nährlösung, das Passagieren der Zellen sowie die Versuchsvorbereitungen. Mikrobiologische Untersuchungen, die regelmäßig durchgeführt wurden, erbrachten keine Hinweise auf eine bakterielle Kontamination oder Pilzbefall.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T25 Zellkulturflaschen, in denen sich jeweils 15 ml Nährlösung befanden. Danach wurden die Zellen täglich mit dem Mikroskop begutachtet und alle zwei Tage erfolgte ein Wechsel des Nährmediums. Bei Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen passagiert.

Dafür wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und die Platten zweimal mit 8 ml DMEM/F12 gewaschen. Anschließend wurden 8 ml Trypsin zum Ablösen der Zellen auf die Oberfläche aufgebracht und die Flasche für 1 Minute bei 37°C inkubiert. Nach der folgenden mikroskopischen Kontrolle wurde die Trypsin-Zell-Lösung mit einer sterilen Pipette aufgenommen und der Plattenboden dabei nochmals abgespült. Die Lösung wurde dann in ein 50 ml Polypropylene-Röhrchen mit 1 ml fetalem Kälberserum (FCS), welches als Trypsin-Inhibitor fungierte, pipettiert und die Flasche nochmals mit 8 ml DMEM/F12 nachgespült. Die Zellgewinnung erfolgte dann durch Zentrifugation bei 37°C und 248 x g für 5 Minuten.

Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in Nährmedium resuspendiert und unter dem Mikroskop gezählt. Für die Versuchsreihen wurden 12-Well-Platten gewählt und  $5 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesät. Die weitere Passage und Aussaat der Stammkulturen erfolgte im Verhältnis 1:3 oder höher verdünnt.

Das Zellwachstum wurde täglich mikroskopisch begutachtet und jeden zweiten Tag erfolgte ein Wechsel des Nährmediums. Pro Well wurden 2 ml Medium verwendet, wobei die Zellen nach 1-3 Tagen (im Durchschnitt am 2. Tag) Konfluenz erreichten und in den Versuchen zum Einsatz kamen.

#### **II.2.4 Versuchsdurchführung**

Die zur Stimulation verwendeten Mediatoren Calciumionophor A23187 und das bakterielle Tripeptid fMLP wurden in Aliquots mit einer definierten Konzentration bei -20°C gelagert. Zur Herstellung einer Stammlösung und daraus gewonnenen weiteren Verdünnungsstufen wurde ein Nährmedium verwendet, welches nur 1 % FCS enthielt, um die Proteinbindung der Stimulationssubstanzen so gering wie möglich zu halten. Während der Herstellung der Stammlösung und der Verdünnungsstufen wurde mit vorgekühlten Medien und auf Eis gelagerten Proben gearbeitet. Das Probenvolumen bei den Versuchsreihen wurde jeweils mit 1000 µl/Well festgelegt, wobei die gewünschte Endkonzentration der Stimulatoren (jeweils 1 µM) durch 100 µl/Well erreicht wurde.

Vor Durchführung des Versuches wurde das Nährmedium aus den Platten abgesaugt, die B2B- oder A549-Zellen zweimal mit je 1 ml HH+/+ gewaschen und mit der benötigten Menge HH+/+ bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> beschichtet. Dies geschah je nach Versuchsprotokoll entweder direkt vor Stimulation oder mit Vorinkubation. Nach dem letzten Waschschrift bei der Isolierung der PMN wurden auch diese in HH+/+ aufgenommen, wonach die Konzentration

der Zellen  $5 \times 10^6$  PMN/100 $\mu$ l/Well betrug. Die Stimulation erfolgte dann gemäß den Versuchsprotokollen im Wasserbad bei 37°C für 10 Minuten unter regelmäßigem Schütteln, um einer Aggregation der Zellen vorzubeugen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Kühlung auf 4°C und durch Zentrifugation bei 1200 x g abgestoppt.

Für die Messung des respiratory burst wurde den Zellen je nach Ansatz Cytochrom- oder Cytochrom/SOD-Lösung zugegeben, während zur Elastasebestimmung kein Cytochrom benötigt wurde. Das Volumen in den Wells wurde mit HH+/+ jeweils so aufgefüllt, dass während der Stimulationszeit ein Gesamtvolumen von 1000  $\mu$ l/Well bestand. Die Ansätze für Mess- und Leerwerte wurden jeweils gleichzeitig stimuliert.

Die gesamte Vorbereitung verlief unter sterilen Bedingungen. Während der Inkubation im Wasserbad waren die 12-Well-Platten mit Deckel verschlossen.



### III Ergebnisse

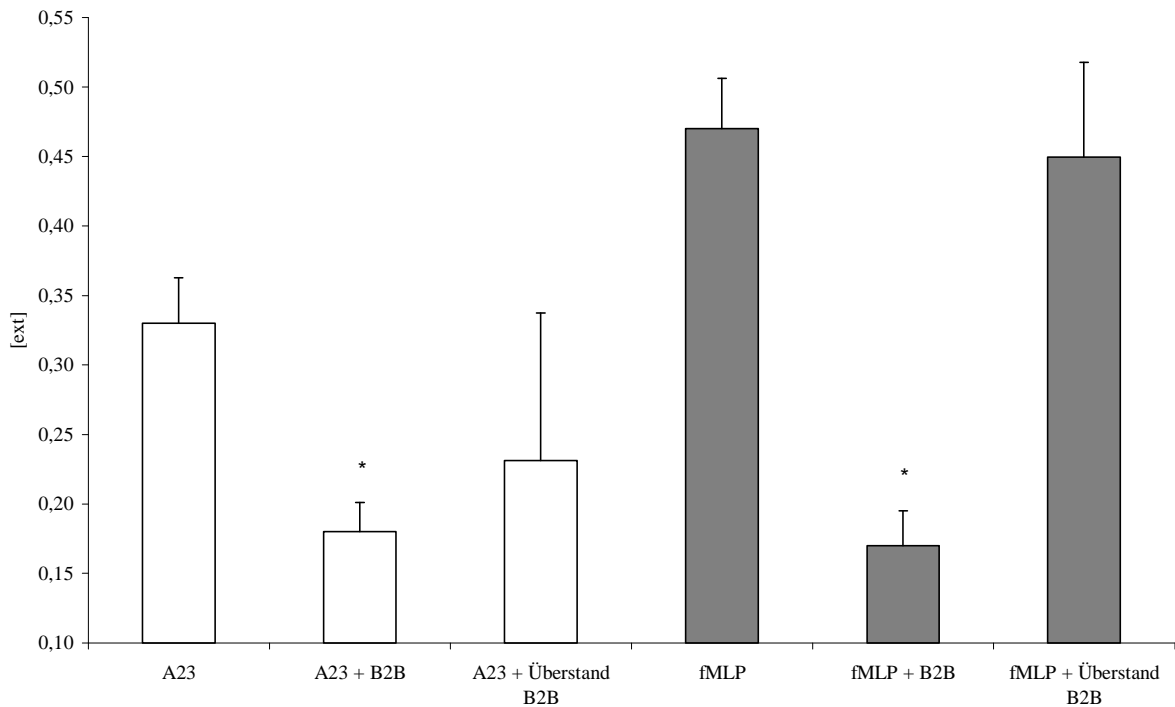
#### III.1 Untersuchungen zum Effekt von Bronchialepithelzellen auf destruktive granulozytäre Zellreaktionen.

*Koinkubation von neutrophilen Granulozyten und Bronchialepithelzellen führt zu reduzierter Aktivierung von Respiratory Burst und Degranulierung*

Die ersten Experimente untersuchten unter der Prämisse von Zell-Zell-Interaktionen den Einfluss von Bronchialepithelzellen (B2B) auf die Aktivierung von Sauerstoffradikalbildung und Degranulierung neutrophiler Granulozyten. Hierfür wurden isolierte PMN mit B2B-Monolayern koinkubiert bzw. „alleine“ inkubiert und mit dem Calciumionophor A23187 (A23) oder dem bakteriellen Tripeptid formyl-Met-Leucin-Phenylalanin (fMLP) aktiviert und die Sauerstoffradikal- und Elastasefreisetzung in den Zellüberstand quantifiziert. Hier konnten wir belegen, dass die B2B regulatorischen Einfluss ausüben und es zur Hemmung der destruktiven granulozytären Mechanismen respiratory burst und Degranulierung kommt. In Granulozyten, die mit B2B-Zellen koinkubiert wurden, zeigte sich eine Halbierung der Superoxidanion-Freisetzung: Im Mittel wurde die Extinktion vom respiratory burst bei Aktivierung mit 1  $\mu$ M A23 von 0,33 auf 0,18 U/l und bei Aktivierung mit 1  $\mu$ M fMLP von 0,47 auf 0,17 U/l reduziert. Parallel zum respiratory burst zeigten sich ähnliche Daten für die Extinktion der Degranulierung mit einer Reduktion der Elastasefreisetzung von 14,77 auf 9,60 U/l bei Stimulation mit A23 und 1,72 auf 1,00 U/l bei Stimulation mit fMLP (Abbildungen 3a+b).

Im nächsten Schritt prüften wir, ob es sich um einen Zell-Zell-Kontakt-abhängigen oder -unabhängigen Einfluss handelt. Hierbei wurden die Granulozyten entweder direkt mit B2B-Zellen inkubiert oder in konditioniertem Medium der B2B-Zellen, welches durch 60-minütige Inkubation gewonnen wurde („Überstand“), d.h. die PMN-Aktivierung fand ohne direkten Kontakt zu B2B-Zellen statt. Wie in den Abbildungen 3a und 3b dargestellt, zeigte sich hier der prägnanteste Effekt auf den respiratory burst wie auch die Degranulierung, wenn ein direkter Kontakt von PMN und B2B gegeben war. Wurden die PMN im Überstand der B2B-Zellen stimuliert, entwickelte sich beim respiratory burst keine Hemmung der inflammatorischen Granulozytenfunktionen; für die Elastase-Degranulierung war zwar ein signifikanter, jedoch geringerer inhibitorischer Effekt als bei direktem Zell-Zell-Kontakt zu

beobachten. Bei allen weiteren Versuchen wurden diese Stimulationsbedingungen beibehalten, d.h. die PMN-Aktivierung fand in direktem Kontakt mit den Bronchialepithelzellen statt.



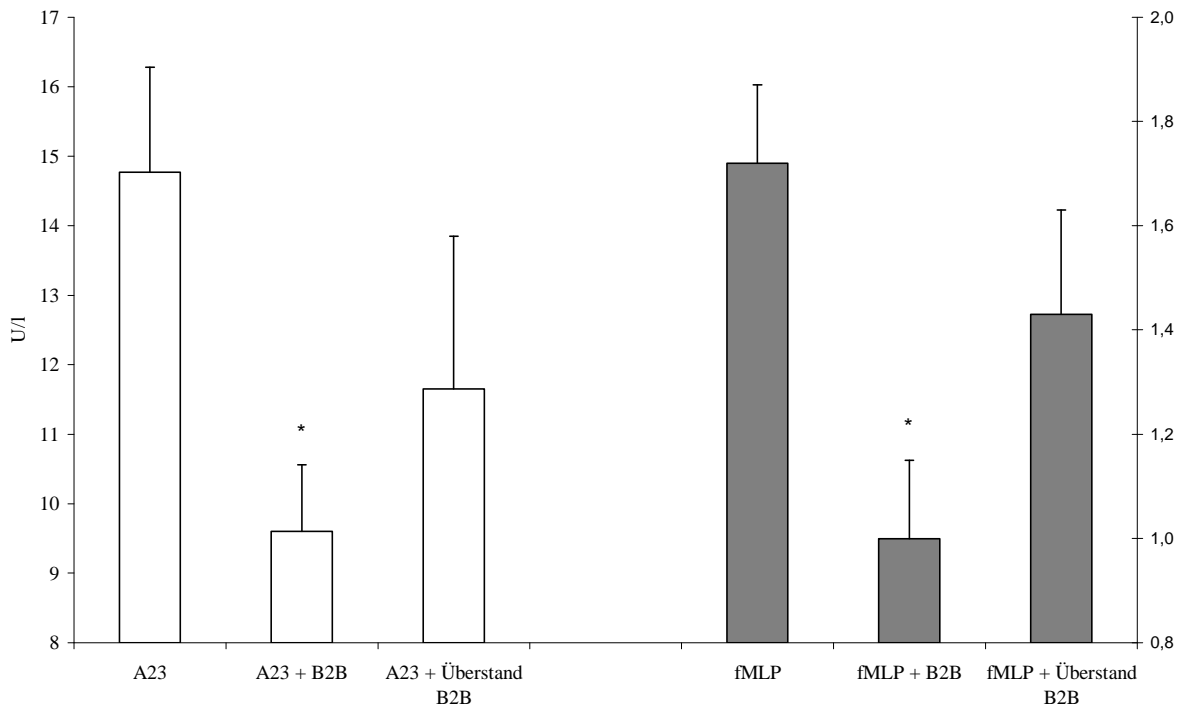
**Abbildung 3a: Aktivierung des respiratory burst bei Koinkubation von Bronchialepithelzellen mit PMN oder Überstand mit PMN:**

$5 \times 10^6$  PMN/ml wurden entweder direkt auf den B2B mit dem frisch aufgebrachten Versuchsmedium (HH +/+) oder separat mit dem 60-minütigen Überstand koinkubiert und anschließend mit  $1 \mu\text{M}$  A23 (weiße Säulen) oder fMLP (graue Säulen) für 10 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  stimuliert.

Die Produktion von Superoxidanion im Zellüberstand ist über die Extinktion [ext] bei 546 nm angegeben.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (+/- sem) aus 5 unabhängigen Experimenten.

Die mit \* gekennzeichneten Säulen unterscheiden sich signifikant von korrespondierenden Werten ohne B2B-Zellen ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 3b: Aktivierung der Degranulierung bei Koinkubation von Bronchialepithelzellen mit PMN oder Überstand mit PMN:**

$5 \times 10^6$  PMN/ml wurden entweder direkt auf den B2B mit dem frisch aufgebrauchten Versuchsmedium (HH +/+) oder separat mit dem 60-minütigen Überstand koinkubiert und anschließend mit  $1 \mu\text{M}$  A23 (weiße Säulen) oder fMLP (graue Säulen) für 10 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  stimuliert.

Die Elastaseaktivität im Zellüberstand wurde als Marker für eine abgelaufene Degranulierung quantifiziert und ist als U/l angegeben.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (+/- sem) aus 5 unabhängigen Experimenten.

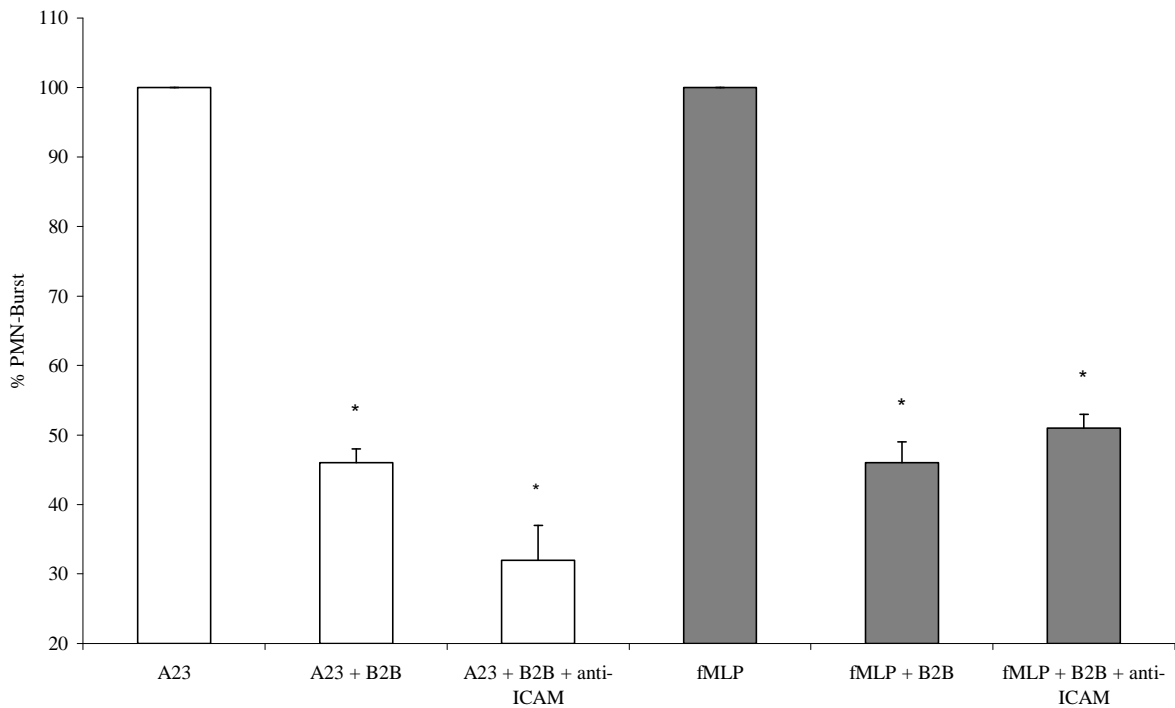
Die mit \* gekennzeichneten Säulen unterscheiden sich signifikant von korrespondierenden Werten ohne B2B-Zellen ( $p < 0,05$ ).

### III.1.1 Zelladhäsion und inflammatorisches Granulozytenverhalten

*Blockade der  $\beta_2$ -Integrin-ICAM* vermittelten Zelladhäsion hat keinen Einfluss auf das Regulationsverhalten der Bronchialepithelzellen.

Im Rahmen der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten spielt ein erstes Rollen der Granulozyten über Endothel oder Epithel und die anschließende feste Adhäsion eine entscheidende Rolle. Um einen eventuellen Zusammenhang mit dem Regulationsverhalten der Bronchialepithelzellen auf die PMN zu untersuchen, wurden die B2B 20 Minuten mit einem funktionsblockierendem Antikörper (anti-ICAM) gegen das epitheliale, mit dem granulozytären Integrin interagierende Adhäsionsmolekül ICAM vorinkubiert und

anschließend mit Granulozyten koinkubiert. Wie in Abbildung 4 dargestellt, hatte die Blockade der  $\beta_2$ -Integrin/ICAM-1-abhängigen Adhäsion durch anti-ICAM allerdings keinen Einfluss auf die regulatorische Funktion der B2B-Zellen beim respiratory burst.



**Abbildung 4: Aktivierung des respiratory burst unter Blockade der ICAM-1-abhängigen Adhäsion bei PMN-B2B-Koinkubation**

Die konfluenten B2B wurden zunächst für 20 Minuten mit einem funktionsblockierendem Antikörper gegen ICAM (anti-ICAM, Konzentration 50  $\mu\text{g/ml}$ ) vorinkubiert. Danach wurden sie mit  $5 \times 10^6$  PMN/ml koinkubiert, welche dann mit 1  $\mu\text{M}$  A23 (weiße Säulen) oder fMLP (graue Säulen) für 10 Minuten bei 37°C stimuliert wurden.

Die Produktion von Superoxidanion im Zellüberstand ist prozentual, bezogen auf die Kontrolle ohne Inhibitor, angegeben.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ( $\pm$  sem) aus 5 unabhängigen Experimenten.

Der Antikörper an sich hatte keinen Einfluss auf die granulozytäre Sauerstoffradikal-Freisetzung.

Signifikante Veränderungen (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

### III.1.2 Einfluss pharmakologischer Inhibition des Lipidmediatormetabolismus

*Indometacin, Aspisol und MK886 können den regulatorischen Effekt der Bronchialepithelzellen nicht antagonisieren.*

Da viele Lipidmediatoren über auto- und parakrine Mechanismen einen wesentlichen Beitrag zur Steuerung des granulozytären Reiz-Antwort-Verhaltens leisten, untersuchten wir deren Beteiligung an der Hemmung des inflammatorischen Granulozytenverhaltens durch die Interaktion mit Bronchialepithelzellen. Bekannte antiinflammatorische Mediatoren wurden pharmakologisch inhibiert, um zu untersuchen, welche Rolle sie möglicherweise im Rahmen der regulatorischen Effekte der B2B spielen und wie die sekundären Zellreaktionen respiratory burst und Degranulierung beeinflusst werden. Hierbei fanden Indometacin, Aspisol, Theophyllin und MK886 Anwendung. Die Konzentrationen der Inhibitoren sind den Tabellen 4a+b zu entnehmen.

Die unspezifischen Cyclooxygenaseinhibitoren Indometacin und Aspisol (Acetylsalicylsäure) wurden verwendet, um die Prostaglandinsynthese zu beeinflussen. Die Produktion von PGD<sub>2</sub>, 15deoxy $\Delta^{12-14}$ prostaglandin J<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub>, denen ein antiinflammatorischer Effekt nachgewiesen werden konnte,<sup>70</sup> ließ sich so unterbinden. Die Inkubationszeit betrug für Indometacin und Aspisol je 60 Minuten im Überstand der B2B. Es ließ sich aber weder der inhibitorische Effekt der B2B auf den granulozytären respiratory burst noch auf die Degranulierung durch Inhibition der Cyclooxygenase aufheben (Tabellen 4a+b).

Den Syntheseweg der antiinflammatorischen Lipoxine blockierten wir mit dem 5-Lipoxygenase-Inhibitor MK886. Dabei wurde auf Versuchsreihen bezüglich der Sauerstoffradikalbildung verzichtet, da MK886 mit dem Cytochrom-Essay interferiert. Aber auch nach Applikation von MK886, bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten, ließ sich keine signifikante Änderung in der Hemmung der Granulozytenaktivität durch die B2B feststellen (Tabelle 4b).

Die konfluenten B2B wurden in je 5 unabhängigen Experimenten mit den Inhibitoren vorinkubiert und im Anschluss mit  $5 \times 10^6$  PMN/ml koinkubiert. Die Aktivierung der PMN erfolgte mit 1  $\mu$ M A23 oder 1  $\mu$ M fMLP für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad.

**Tabelle 4a: Effekt von Lipidmediatorinhibitoren bei A23- und fMLP-induziertem respiratory burst von PMN in Koinkubation mit Bronchialepithelzellen**

Induktor	Indometacin (50 $\mu$ M)		Aspisol (250 $\mu$ M)		Inhibitor
	%-MW	sem	%-MW	sem	
A23	48	16	77	6	Nein
	46	21	72	9	Ja
fMLP	56	4	75	4	Nein
	37	4	71	6	Ja

*%-MW, prozentualer Mittelwert bezogen auf Kontrolle (= PMN in Abwesenheit von B2B); sem, Standardfehler des Mittelwertes*

**Tabelle 4b Effekt von Lipidmediatorinhibitoren bei A23- und fMLP-induzierter Degranulierung von PMN in Koinkubation mit Bronchialepithelzellen**

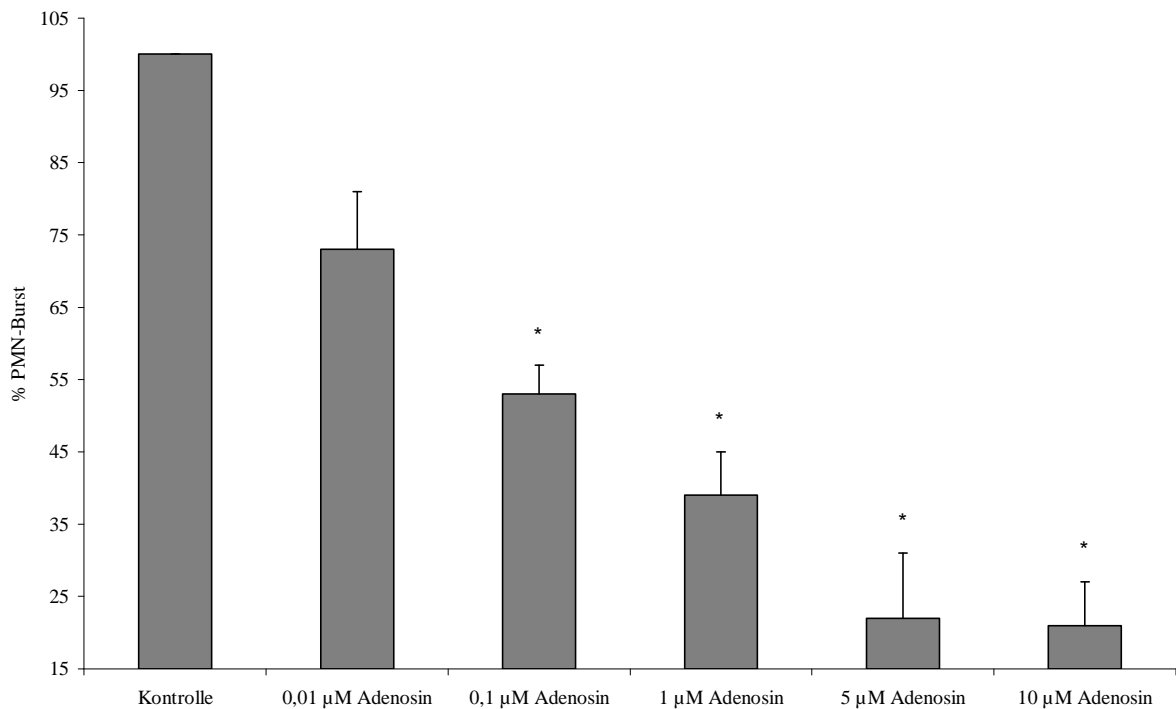
Induktor	Indometacin (50 $\mu$ M)		Aspisol (250 $\mu$ M)		MK886 (10 $\mu$ M)		Inhibitor
	%-MW	Sem	%-MW	sem	%-MW	sem	
A23	77	8	65	7	55	5	Nein
	61	6	56	6	45	15	Ja
fMLP	60	7	67	18	60	4	Nein
	69	4	70	7	62	11	Ja

*%-MW, prozentualer Mittelwert bezogen auf Kontrolle (= PMN in Abwesenheit von B2B)  
sem, Standardfehler des Mittelwertes*

### III.1.3 Einfluss von Adenosin auf das inflammatorische Granulozytenverhalten

*Exogenes Adenosin hemmt die Aktivierung destruktiver granulozytärer Zellreaktionen von fMLP-stimulierten neutrophilen Granulozyten, jedoch nicht bei Stimulation mit A23.*

Um den bekannten antiinflammatorischen Effekt von Adenosin unter Bedingungen wie sie bei unseren Versuchsreihen vorlagen, genauer zu betrachten, führten wir Messreihen mit exogen zugeführtem Adenosin durch. Dabei wurden steigende Adenosinkonzentrationen von 0,01 bis 5 bzw. 10  $\mu\text{M}$  appliziert. Auffällig am Ergebnis dieser Messreihen war, dass A23 stimulierte Granulozyten ihr Reaktionsverhalten nicht signifikant änderten (nicht dargestellt), während fMLP stimulierte Granulozyten eine dosisabhängige Supprimierung von respiratory burst und Degranulierung zeigten (Abbildungen 5a+b). Den ausgeprägtesten Effekt erzielten wir mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Adenosin sowohl beim respiratory burst als auch bei der Degranulierung mit einer Reduktion der Granulozytenaktivität auf 22 % (respiratory burst) bzw. 32 % (Degranulierung). Eine weitere Erhöhung der Adenosinkonzentration auf 10  $\mu\text{M}$  bewirkte keine signifikante Änderung (respiratory burst 21 %, Degranulierung 33 %) mehr.



**Abbildung 5a: fMLP-induzierte Aktivierung des respiratory burst von PMN unter Einfluss von exogenem Adenosin**

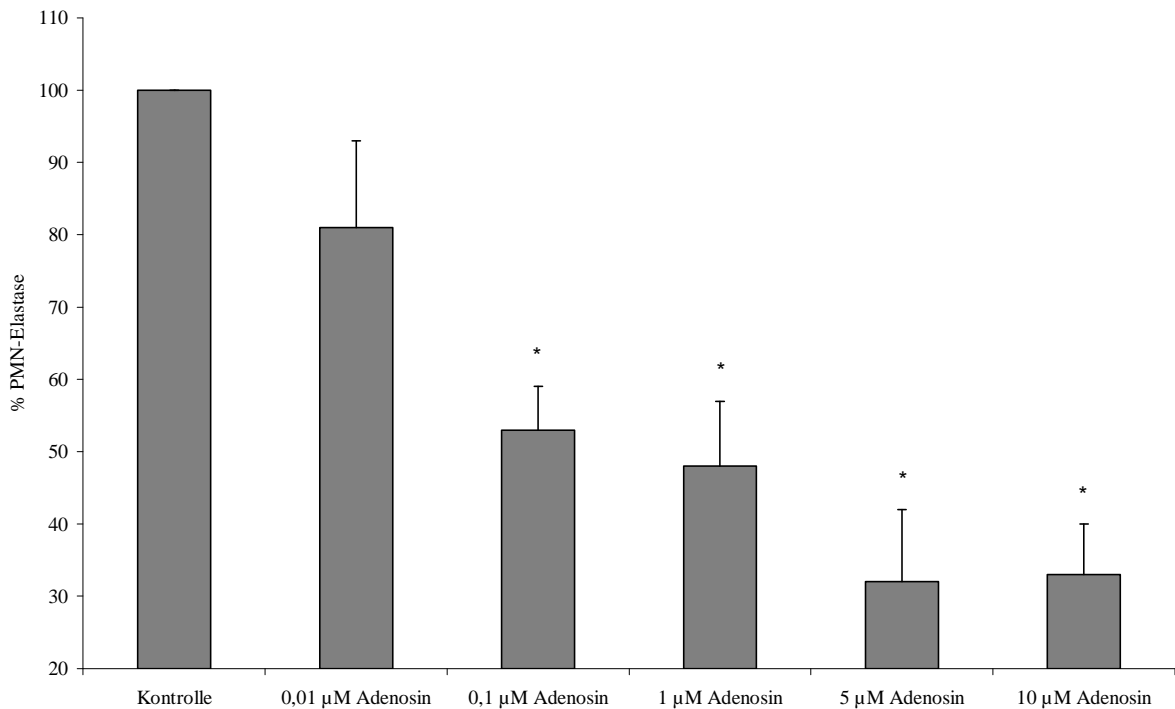
*5 x 10<sup>6</sup> PMN/ml wurden in nativem Zustand belassen oder mit steigenden Konzentrationen von exogenem Adenosin für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit 1 µM fMLP für 10 Minuten bei 37°C aktiviert.*

*Die Produktion von Superoxidanion im Zellüberstand ist prozentual, bezogen auf die Kontrollgruppe ohne Adenosin, angegeben.*

*Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (+/- sem) aus 4 unabhängigen Experimenten.*

*Mit \* markierte Werte unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von der Kontrolle.*





**Abbildung 5b: fMLP-induzierte Aktivierung der Degranulierung von PMN unter Einfluss von exogenem Adenosin:**

$5 \times 10^6$  PMN/ml wurden in nativem Zustand belassen oder mit steigenden Konzentrationen von exogenem Adenosin für 5 Minuten koinkubiert und anschließend mit  $1 \mu\text{M}$  fMLP für 10 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  aktiviert. Die Elastaseaktivität im Zellüberstand ist prozentual, bezogen auf die Kontrollgruppe ohne Adenosin, wiedergegeben.

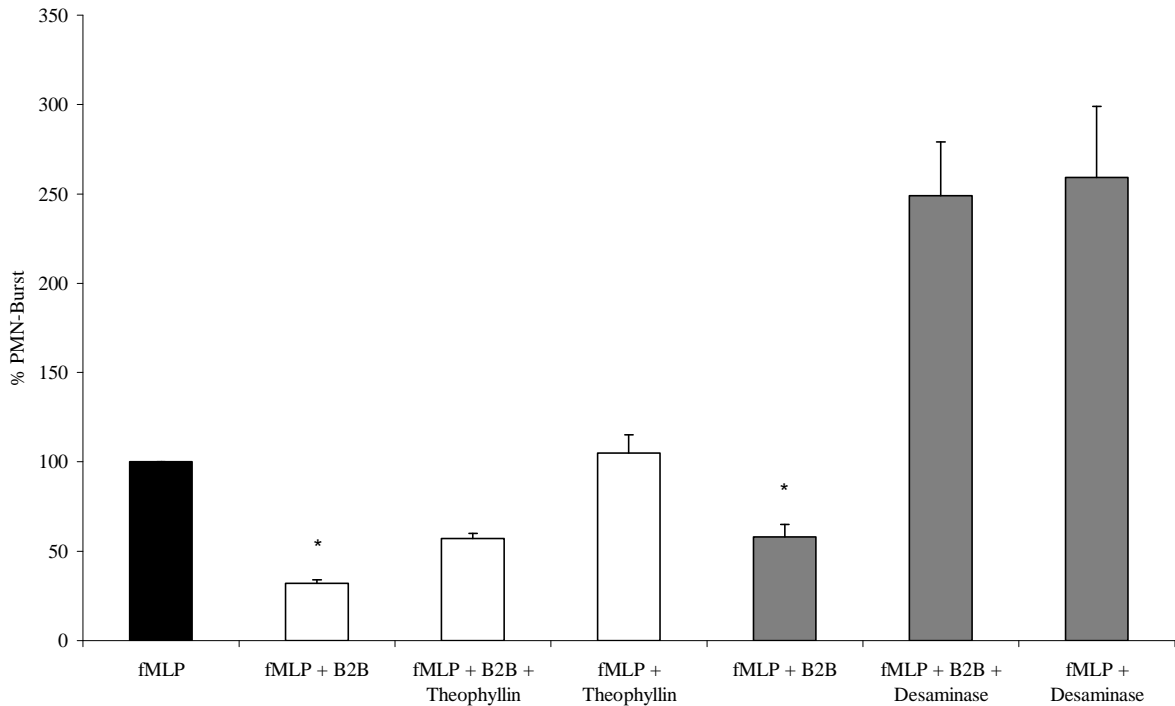
Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ( $\pm$  sem) aus 4 unabhängigen Experimenten.

Mit \* markierte Werte unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von der Kontrolle.

*Adenosin-Desaminase und Theophyllin heben den regulatorischen Einfluss der Bronchial-epithelzellen bei Stimulation mit fMLP auf, jedoch nicht bei Induktion mit A23*

Um die Versuchsergebnisse mit exogenem Adenosin bei B2B-Granulozyten-Koinkubationen zu verifizieren, applizierten wir Adenosin-Desaminase. Das Enzym desaminiert Adenosin zu Inosin und schafft so ein Adenosin-freies Milieu, in dem die isolierten PMN stimuliert werden, was uns ermöglichte, den Einfluss von exogenem Adenosin auf die Granulozyten weiter zu differenzieren. Wir setzten je 25 U Adenosin-Desaminase für 10 Minuten den B2B-Zellen zu und erhielten Messwerte, die belegten, dass fMLP-aktivierte Granulozyten jetzt keine Supprimierung von respiratory burst oder Degranulierung in Koinkubation mit B2B mehr erfuhren (Abbildungen 6a+b). Die verminderte Aktivität im Rahmen der Degranulierung steigerte sich nach Adenosin-Desaminase-Gabe von 26 % auf 76 % während bei Messung des respiratory burst eine überschießende Antagonisierung von 58 % auf 249 % stattfand. Im Gegensatz dazu konnten wir keinen antagonistischen Effekt bei Stimulation mit A23 beobachten (nicht dargestellt).

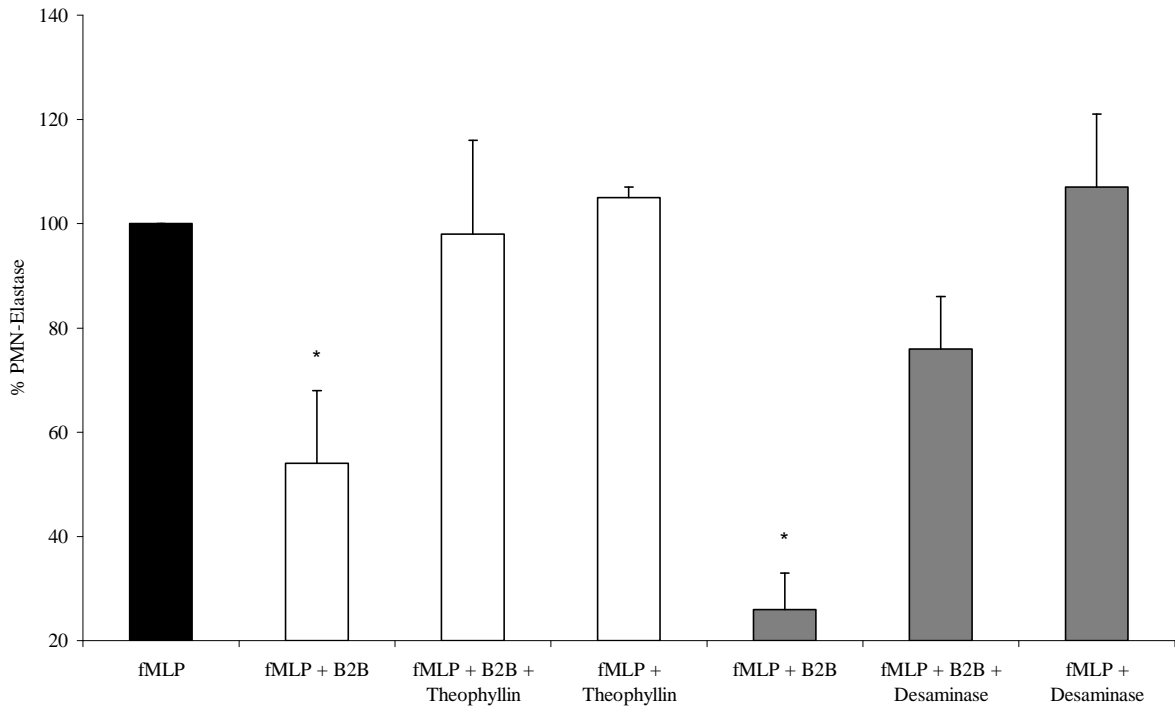
Einen teilweise antagonistischen Effekt auf die Down-Regulation der Granulozytenfunktion fanden wir auch beim Einsatz des Adenosinantagonisten Theophyllin. Theophyllin wirkt als unspezifischer Antagonist auf die Adenosinrezeptoren A1 und A2 und nach 10 Minuten Inkubationszeit und einer Dosierung von 5  $\mu$ M Theophyllin beobachteten wir eine partielle Restitution des regulatorischen Einflusses beim respiratory burst von 32 % auf 57 % bezogen auf die Kontrolle und bei der Degranulierung eine nahezu komplette Aufhebung der Hemmung mit einer Steigerung von 76 % auf 98 % bezogen auf die Kontrolle.



**Abbildung 6a: fMLP-induzierte Aktivierung des respiratory burst von PMN unter Einfluss von Adenosin-Desaminase bzw. Theophyllin:**

Die konfluentes B2B wurden mit 25 U Adenosin-Desaminase (weiße Säulen) bzw. 5  $\mu\text{M}$  Theophyllin (graue Säulen) für 10 Minuten vorinkubiert. Im Anschluss wurden zur Koinkubation  $5 \times 10^6$  PMN/ml zupipettiert, welche wiederum mit 1  $\mu\text{M}$  fMLP für 10 Minuten bei 37°C stimuliert wurden. Die Produktion von Superoxid anion im Zellüberstand ist prozentual, bezogen auf die Kontrolle ohne Inhibitor, angegeben.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ( $\pm$  sem) aus 5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Veränderungen (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.



**Abbildung 6b: fMLP-induzierte Aktivierung der Degranulierung von PMN unter Einfluss von Adenosin-Desaminase bzw. Theophyllin:**

Die konfluentes B2B wurden mit 25 U Adenosin-Desaminase (weiße Säulen) bzw. 5  $\mu$ M Theophyllin (graue Säulen) für 10 Minuten vorinkubiert. Im Anschluss wurden zur Koinkubation  $5 \times 10^6$  PMN/ml zupipettiert, welche wiederum mit 1  $\mu$ M fMLP für 10 Minuten bei 37°C stimuliert wurden. Die Elastaseaktivität im Zellüberstand ist prozentual, bezogen auf die Kontrolle ohne Inhibitor, wiedergegeben.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ( $\pm$  sem) aus 5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Veränderungen (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

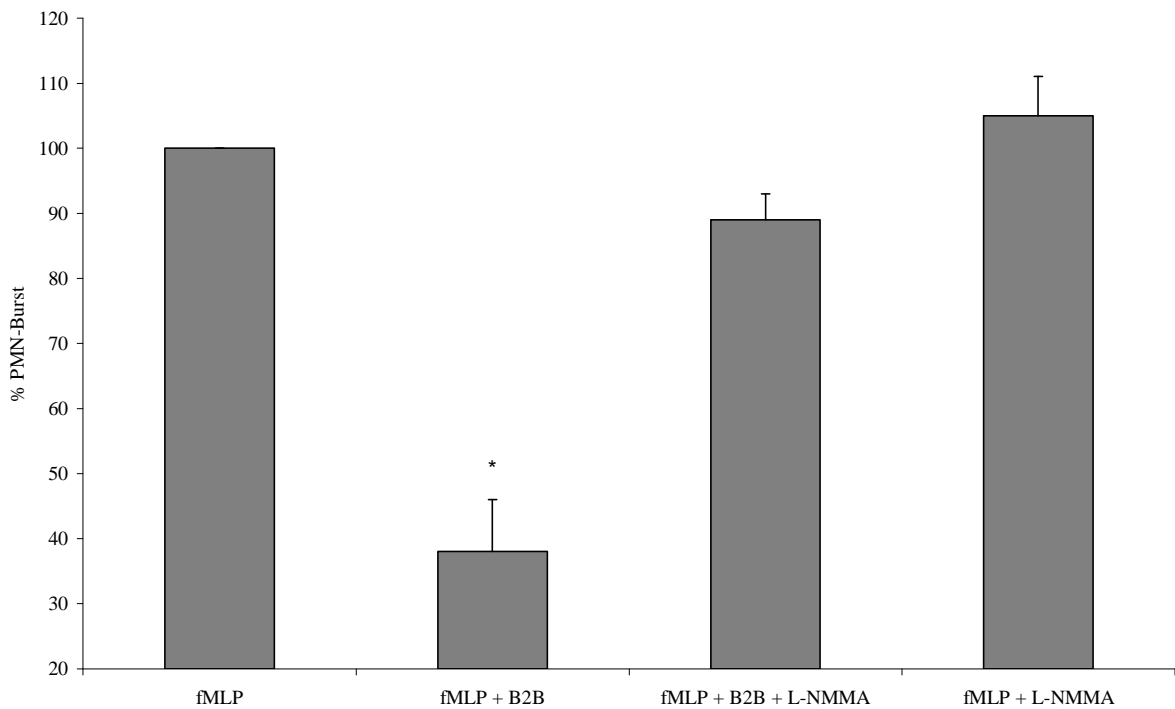
### III.1.4 Einfluss pharmakologischer Inhibition der NO-Synthase

*L-NMMA antagonisiert den regulatorischen Einfluss der Bronchialepithelzellen auf neutrophile Granulozyten.*

Neben Lipidmediatoren hat auch Stickstoffmonoxid Einfluss auf granulozytäre Funktionen und spielt im Regelwerk des Immunsystems und bei entzündlichen Vorgängen eine wichtige Rolle. Zum einen stellt NO auch selbst ein toxisches Verteidigungsmolekül gegen Krankheitserreger dar und zum anderen reguliert es viele Funktionen von am Immungeschehen beteiligten Zellen.

Die NO-Synthase wurde von uns durch Gabe des methylierten Substrates N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), einem kompetitiven Inhibitor der NO-Synthase und am terminalen Guanidin-Stickstoff substituiertes Derivat des L-Arginin, blockiert. Interessanterweise zeigte sich, dass durch diese Interaktion mit der epithelialen NO-Synthase der inhibitorische Effekt der Bronchialepithelien auf die inflammatorische Aktivität von fMLP-stimulierten PMN aufgehoben werden konnte. Die Abbildungen 7a+b stellen diesen Befund grafisch dar. In Gegenwart von L-NMMA zeigte sich eine nahezu komplette Rekonstitution des respiratory burst in PMN-B2B-Kokulturen: Es fand eine Steigerung der supprimierten Aktivität von 38 % auf 89 % statt. Parallel dazu konnten wir auch eine Wiederherstellung der Elastasefreisetzung in Gegenwart von L-NMMA zeigen: es fand eine Erhöhung von 77 % auf 108 % statt. Im Gegensatz dazu ließ sich wiederum die Hemmung der granulozytären Funktionen in A23-aktivierten PMN nicht beeinflussen (nicht dargestellt).

Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurde im nächsten Schritt den Granulozyten ein PDE5-Inhibitor zugeführt, um eine intrazelluläre Erhöhung von zyklischem Guanylmonophosphat hervorzurufen. Dieser second messenger mediert die intrazelluläre Signaltransduktion von NO. Wie wir vermuteten, kam es auch hier durch den PDE5-Inhibitor Zaprinast zu einer dosisabhängigen Supprimierung des respiratory burst, die in Abbildung 8 dargestellt ist. Auf diesem Weg war es uns möglich, auch indirekt zu belegen, dass der Einfluss von NO zu einer Reduktion im inflammatorischen granulozytären Reaktionsverhalten führt.



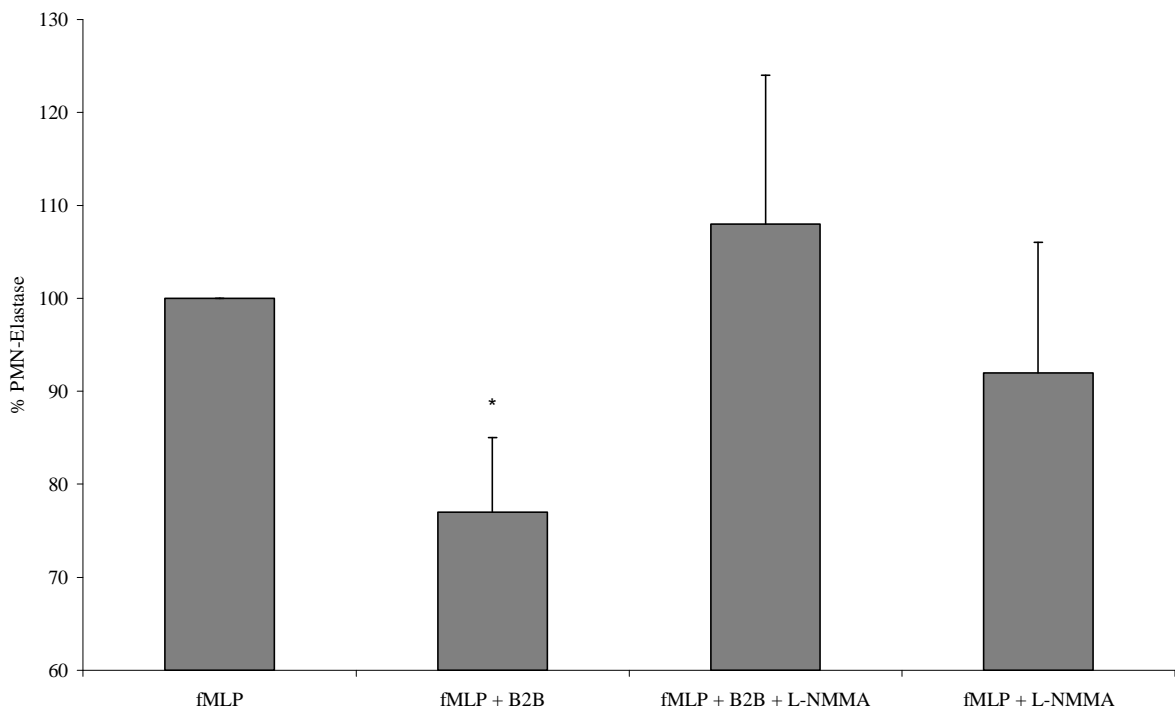
**Abbildung 7a: fMLP-induzierte Aktivierung des respiratory burst unter NO-Blockade durch L-NMMA bei PMN-B2B-Koinkubation:**

Die konfluente Schicht der B2B wurde mit 100  $\mu\text{M}$  L-NMMA für 10 Minuten vorinkubiert. Im Anschluss wurden sie mit  $5 \times 10^6$  PMN/ml koinkubiert, welche wiederum mit 1  $\mu\text{M}$  fMLP für 10 Minuten bei 37°C stimuliert wurden.

Die Produktion von Superoxidanion im Zellüberstand ist prozentual, bezogen auf die Kontrolle ohne Inhibitor, angegeben.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (+/- sem) aus 5 unabhängigen Experimenten.

Signifikante Veränderungen (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.



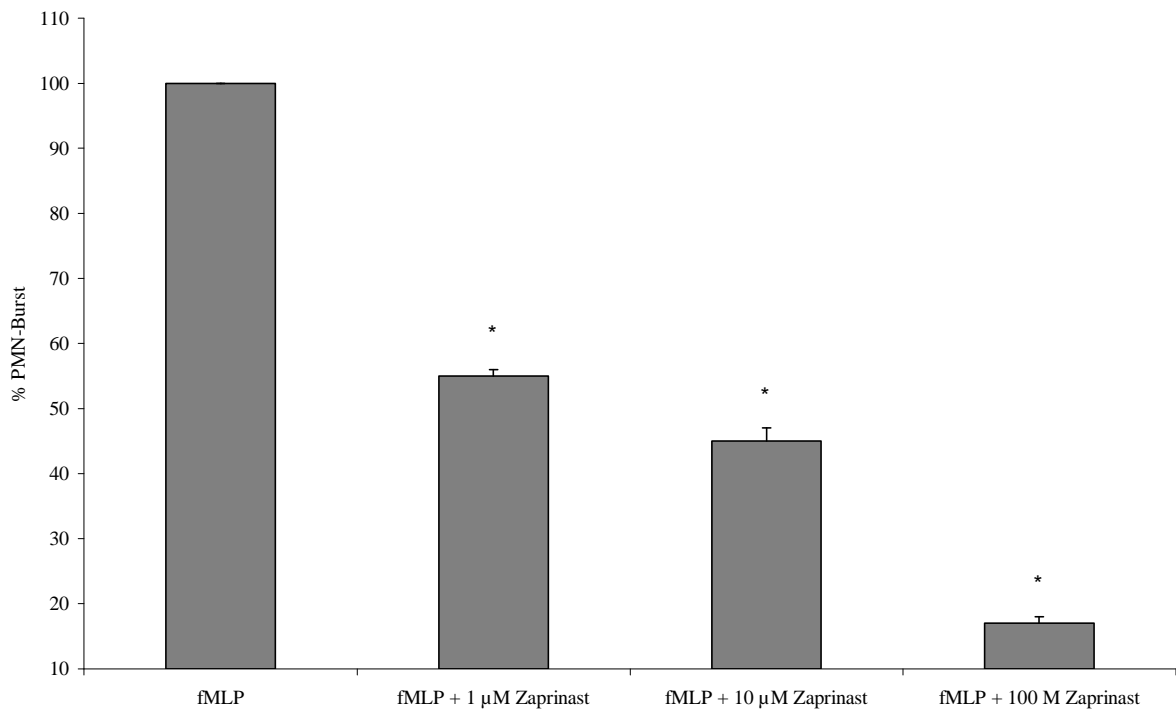
**Abbildung 7b: fMLP-induzierte Aktivierung der Degranulierung unter NO-Blockade durch L-NMMA bei PMN-B2B-Koinkubation:**

Die konfluente Schicht der B2B wurde mit 100  $\mu\text{M}$  L-NMMA für 10 Minuten vorinkubiert. Im Anschluss wurden sie mit  $5 \times 10^6$  PMN/ml koinkubiert, welche wiederum mit 1  $\mu\text{M}$  fMLP für 10 Minuten bei 37°C stimuliert wurden.

Die Elastaseaktivität im Zellüberstand wurde als Marker für eine abgelaufene Degranulierung quantifiziert und ist prozentual, bezogen auf die Kontrolle ohne Inhibitor, angegeben.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ( $\pm$  sem) aus 5 unabhängigen Experimenten.

Signifikante Veränderungen (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.



**Abbildung 8: fMLP-induzierte Aktivierung des respiratory burst unter Zaprinast (PDE5-Inhibitor)**

*5 x 10<sup>6</sup> PMN/ml wurden für 10 Minuten mit steigenden Konzentrationen von Zaprinast koinkubiert und anschließend mit 1 µM fMLP bei 37°C für 10 Minuten stimuliert. Die Produktion von Superoxidanion im Zellüberstand ist prozentual, bezogen auf die Kontrolle ohne Inhibitor, angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (+/- sem) aus 4 unabhängigen Experimenten. Signifikante Veränderungen (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.*



### **III.2 Untersuchungen zum Effekt von Alveolarepithelzellen auf destruktive granulozytäre Zellreaktionen.**

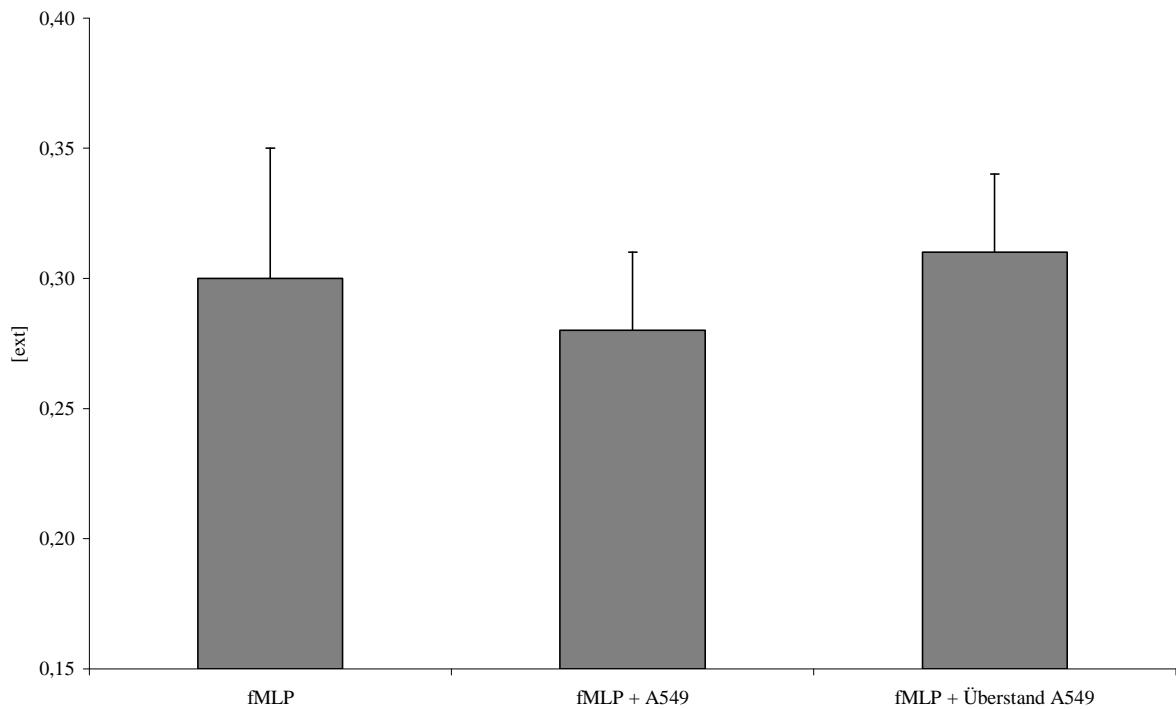
*Koinkubation von neutrophilen Granulozyten und Alveolarepithelzellen führt zu gesteigerter Aktivierung der Degranulierung bei Induktion mit fMLP.*

Zum Vergleich des Einflusses von Bronchialepithelzellen auf neutrophile Granulozyten mit anderen Zelllinien koinkubierten wir Alveolarepithelzellen (A549) mit PMN. Diese transformierte humane Zelllinie wird aus explantierten Lungenkarzinomen gewonnen und zeigt die typischen Charakteristika von alveolären Typ II Zellen.<sup>49</sup>

Auch die ersten Experimente mit Alveolarepithelzellen untersuchten unter der Prämisse von Zell-Zell-Interaktionen den Einfluss auf die Aktivierung von Sauerstoffradikalbildung und Degranulierung neutrophiler Granulozyten. Bei unseren Versuchsreihen mit dieser Zelllinie stellten wir fest, dass die A549 ähnlich den B2B ebenfalls regulatorischen Einfluss ausüben und es zu einer weniger starken Aktivierung der destruktiven granulozytären Mechanismen respiratory burst und Degranulierung kommt, wenn mit A23 stimuliert wurde (nicht dargestellt). Bei Messung des respiratory burst nach Induktion mit fMLP ließ sich kein signifikanter Einfluss auf das Reaktionsverhalten beschreiben; die in Gegenwart der Bronchialepithelien induzierte Hemmung der Superoxidationengese blieb aus. Interessanterweise zeigte sich nach Induktion der Degranulierung mit fMLP eine deutliche Aktivitätszunahme von 1,01 U/l auf 2,01 U/l (Abbildungen 9a+b).

Wiederum war im nächsten Schritt zu prüfen, ob es sich um einen Zell-Zell-Kontakt-abhängigen oder -unabhängigen Einfluss handelt. Dabei wurde der bis zu 60 Minuten vorinkubierte Überstand (HH+/+) abgenommen und die Aktivierung fand ohne direkten Kontakt zu A549-Zellen statt. Wie in den Abbildungen 9a+b dargestellt, zeigte sich hier analog den Ergebnissen mit B2B der prägnanteste Effekt auf respiratory burst wie auch Degranulierung wenn direkter Kontakt von PMN und A549 möglich war. Bei allen weiteren Versuchen wurden diese Stimulationsbedingungen beibehalten und die PMN ohne vorheriges Abnehmen des Überstandes in die Versuchswells pipettiert, so dass die Aktivierung im Medium direkt über den A549 stattfand.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Versuchen zur Inhibierung verschiedener Lipidmediatoren nur die Elastasefreisetzung in den Zellüberstand quantifiziert, da wir hier eine unterschiedliche Einflussnahme von B2B und A549 auf das Reaktionsverhalten neutrophiler Granulozyten gefunden hatten.



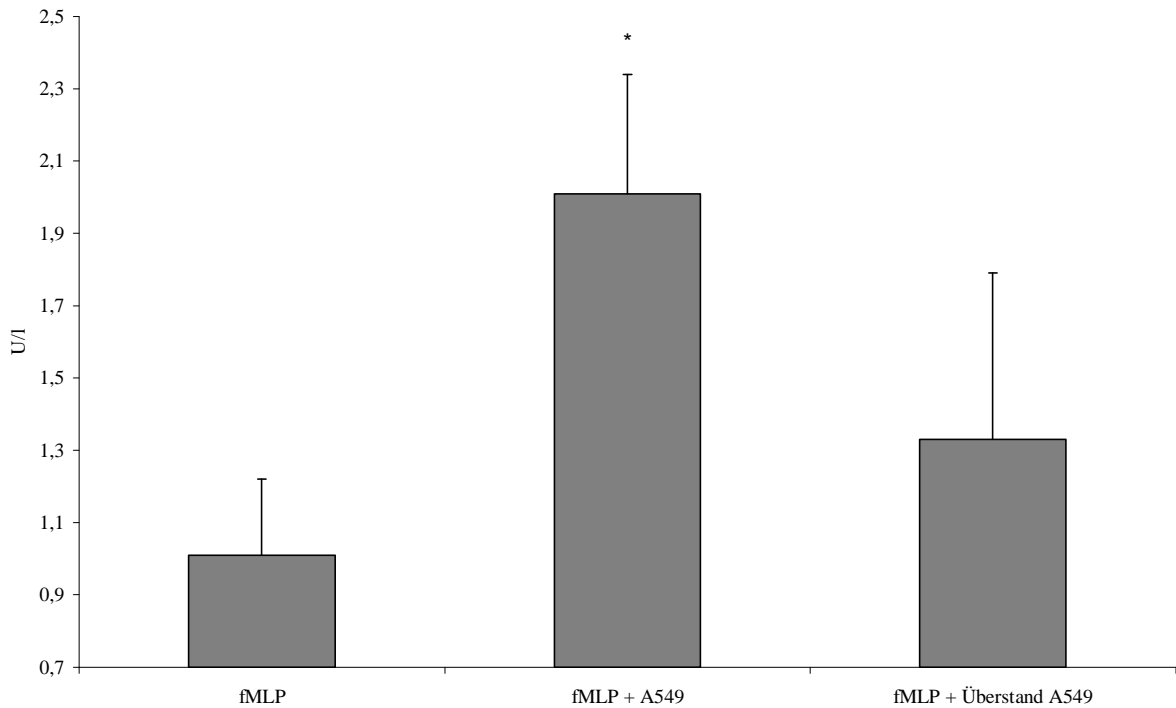
**Abbildung 9a: Aktivierung des respiratory burst mit fMLP bei Koinkubation von Alveolar-epithelzellen mit PMN oder Überstand mit PMN:**

$5 \times 10^6$  PMN/ml wurden entweder direkt auf den A549 mit dem frisch aufgebrauchten Versuchsmedium (HH +/+) oder separat mit dem 60-minütigen Überstand koinkubiert und anschließend mit  $1 \mu\text{M}$  fMLP für 10 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  stimuliert.

Die Produktion von Superoxidanion im Zellüberstand ist über die Extinktion [ext] bei 546 nm angegeben.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ( $\pm$  sem) aus 5 unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Superoxidationengese bei An- oder Abwesenheit der A549-Zellen.



**Abbildung 9b: Aktivierung der Degranulierung mit fMLP bei Koinkubation von Alveolar-epithelzellen mit PMN oder Überstand mit PMN:**

*5 x 10<sup>6</sup> PMN/ml wurden entweder direkt auf den A549 mit dem frisch aufgebrauchten Versuchsmedium (HH +/+) oder separat mit dem 60 minütigen Überstand koinkubiert und anschließend mit 1 µM fMLP für 10 Minuten bei 37°C stimuliert.*

*Die Elastaseaktivität im Zellüberstand wurde als Marker für eine abgelaufene Degranulierung quantifiziert und ist in Units/l angegeben.*

*Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (+/- sem) aus 5 unabhängigen Experimenten.*

*Signifikante Veränderungen (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.*

### III.2.1 Einfluss pharmakologischer Inhibition des Lipidmediatormetabolismus

*Cyclooxygenase- bzw. Thromboxanrezeptorantagonisten können den steigenden Effekt der Alveolarepithelzellen nicht aufheben.*

Analog zu den Versuchen der PMN-B2B-Koinkubation untersuchten wir auch hier die mögliche Einflussnahme von Lipidmediatoren auf die registrierten Zellinteraktionen. Da die Alveolarepithelien einen steigenden Effekt auf das inflammatorische Granulozytenverhalten hatten, konzentrierten wir uns auf proinflammatorische Mediatoren wie verschiedene Prostaglandine und Thromboxane. Thromboxane wirken bronchokonstringierend, erhöhen die mikrovaskuläre Leckage, vermindern die mukoziliare Clearance und induzieren eine Hyperreagibilität der Luftwege.<sup>81</sup> Aber weder Indometacin (Inkubationszeit 60 Minuten) als unspezifischer Cyclooxygenase-Inhibitor noch Daltroban (Inkubationszeit 10 Minuten) als spezifischer Thromboxan-Rezeptorantagonist waren in der Lage, den stimulierenden Effekt der A549 auf die PMN zu beeinflussen. Die verstärkte Degranulierung bei Induktion mit fMLP erfuhr keine signifikante Änderung (Tabelle 5).

Die konfluenten A549 wurden bei diesen Versuchsreihen in je 5 unabhängigen Experimenten mit den Inhibitoren für die genannte Dauer vorinkubiert und im Anschluss mit  $5 \times 10^6$  PMN/ml koinkubiert. Die Aktivierung der PMN erfolgte mit  $1 \mu\text{M}$  A23 oder  $1 \mu\text{M}$  fMLP für 10 Minuten im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$ .

**Tabelle 5: Effekt von Lipidmediatorinhibitoren bei fMLP-induzierter Degranulierung von PMN in Koinkubation mit Alveolarepithelzellen**

Induktor	Indometacin (50 $\mu\text{M}$ )		Daltroban (25 $\mu\text{M}$ )		Inhibitor
	%-MW	sem	%-MW	sem	
fMLP	261	80	187	4	Nein
	207	51	227	38	Ja

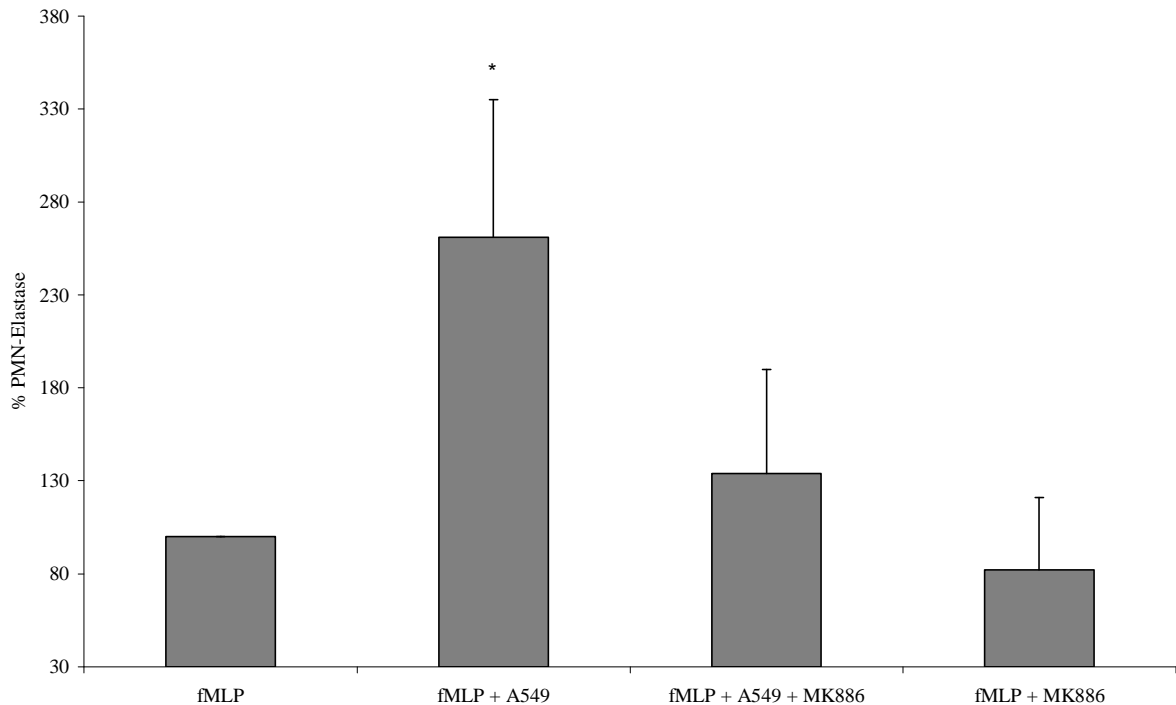
*%-MW, prozentualer Mittelwert bezogen auf Kontrolle; sem, Standardfehler des Mittelwertes*

### III.2.2 Einfluss pharmakologischer Inhibition der 5-Lipoxygenase

*MK886 antagonisiert den aktivierenden Einfluss der Alveolarepithelzellen auf neutrophile Granulozyten bei Induktion mit fMLP.*

Leukotriene als körpereigene Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels, respektive der Lipoxygenase (LO), sind stark wirksame proinflammatorische Mediatoren entzündlicher und allergischer Reaktionen, wirken dabei chemotaktisch, bronchokonstringierend und vasoaktiv und sind Trigger für Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Bei der Genese von Leukotrienen wird der Arachidonsäure molekularer Sauerstoff zugesetzt und Wasserstoff abgespalten. Dieser Vorgang wird katalysiert durch die 5-Lipoxygenase in Kombination mit einem membrangebundenen Aktivierungsprotein (FLAP).<sup>63</sup>

Mit dem 5-LO-Inhibitor MK886, der genau an diesem Aktivierungsprotein angreift, gelang es uns, die gesteigerte Elastasefreisetzung in den Zellüberstand bei Induktion mit fMLP von 261 % auf 134 % zu reduzieren (Abbildung 10). Dagegen zeigte sich kein Effekt bei Stimulation der PMN mit A23 und die Hemmung der Elastasefreisetzung ließ sich nicht antagonisieren (nicht dargestellt). Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen, die wir bei der NO-Inhibierung der B2B durch L-NMMA erhielten. Auch dort konnten wir den regulatorischen Einfluss der Epithelzellen nur bei Induktion mit fMLP inhibieren, nicht jedoch bei Stimulation mit A23.



**Abbildung 10: fMLP-induzierte Aktivierung der Degranulierung unter 5-LO Blockade durch MK886 bei PMN-A549-Koinkubation:**

Die konfluente Schicht der A549 wurde mit 10  $\mu\text{M}$  MK886 für 10 Minuten vorinkubiert. Im Anschluss wurden sie mit  $5 \times 10^6$  PMN/ml koinkubiert, welche wiederum mit 1  $\mu\text{M}$  fMLP für 10 Minuten bei 37°C stimuliert wurden.

Die Elastaseaktivität im Zellüberstand ist prozentual, bezogen auf die Kontrolle ohne Inhibitor, angegeben.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (+/- sem) aus 5 unabhängigen Experimenten.

Signifikante Veränderungen (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

## IV Diskussion

### IV.1 Entwicklung der Fragestellung

Genetische oder erworbene Defekte neutrophiler Granulozyten bzw. Funktionsstörungen neutrophiler Granulozyten können zu einem Verlust oder einer Reduktion Infektabwehrrelevanter Strategien der PMN führen und damit zu einem erheblichen Risiko, vor allem an bakteriellen Infektionen zu erkranken. Beim Leukozytenadhärenzdefekt (LAD) Syndrom kommt es durch genetische Defekte (Punktmutationen, Deletionen) zu einer verminderten Expression oder einem völligen Fehlen von Adhärenzproteinen (CD11b/CD18). Diese Granulozyten können nicht mehr adhäreren, emigrieren und eine lokale Infektion abwehren. Man kennt verschiedene Adhärenzdefekt Syndrome sowie funktionelle Migrationsdefekte anderer bzw. unbekannter Ursachen (z.B. „Lazy Leukocyte Syndrom“). Störungen in der Kaskade zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch genetische Defekte von Enzymen/Koenzymen führen zu einem Verlust der Bakterizidie, was im Rahmen der chronischen Granulomatose (CGD Syndrom) beschrieben ist.

Auch erworbene und passagere Granulozytendefekte und -funktionsstörungen sind bei vielen verschiedenen Erkrankungen zu beobachten, wobei der Zusammenhang auf molekularer Ebene häufig noch nicht geklärt ist.

Alle Funktionsstörungen der Granulozyten zeigen ein Missverhältnis im Regulationsverhalten der PMN: entweder eine übersteigerte Aktivierung oder das Fehlen einer adäquaten Immunantwort. Sind Granulozyten essentiell für eine suffiziente Erregerbekämpfung, so sind sie aber auch an der Pathogenese verschiedener inflammatorischer Konditionen beteiligt wie z.B. beim ARDS. Bei diesem Krankheitsbild kommt es zu einem ausgeprägten Einwandern von PMN in die Lunge, wo durch freigesetzte Oxidantien und hydrolytische Enzyme Gewebnekrosen entstehen können. Daher versucht der Organismus durch Einflussnahme auf die Granulozytenfunktionen die ungewollten überschießenden Reaktionen zu verhindern bzw. zu minimieren. Diese Down-Regulierung der granulozytären Funktionen wiederum könnte verantwortlich sein für die oft letal endenden pulmonalen Infektionen.<sup>82</sup> Eine ausgewogene Balance zwischen stimulierenden und hemmenden Einflüssen ist für die optimale Granulozytenfunktion unbedingte Voraussetzung.

Vor diesem Hintergrund bildete der Einfluss und Effekt von Epithelzellen auf die inflammatorischen PMN-Funktionen und die Möglichkeit der Existenz einer Regulation auf diesem Wege den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

## **IV.2 Down-Regulation von Rezeptor(fMLP)- und Ionophor(A23)-induzierter Granulozytenaktivierung durch Bronchialepithelzellen**

Den Einfluss der Epithelzellen auf das Reaktionsverhalten der PMN untersuchten wir im Hinblick auf die Aktivierung destruktiver granulozytärer Zellreaktionen. Wir bestimmten in unseren Versuchsreihen die Freisetzung von Sauerstoffradikalen (respiratory burst) und Elastase (Degranulierung) in den jeweiligen Zellüberstand. Dabei konnten wir feststellen, dass die Zelllinie B2B als Modell humanen Bronchialepithels eine generelle Hemmung dieser Zellreaktionen hervorruft.

Zur Differenzierung, ob direkter Zellkontakt zwischen B2B und PMN benötigt wird, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich dieses Verhalten auch bei Granulozyten nachweisen ließ, die keinen Kontakt zu Epithelzellen hatten. Hier zeigte sich jedoch ein weitaus stärkerer Einfluss bei direktem Zellkontakt. Eine Hemmung der Integrin-ICAM medierten Adhäsion, die eine wichtige Rolle bei granulozytär induzierten Entzündungsreaktionen spielt,<sup>83</sup> mittels eines funktionsblockierenden Antikörpers (anti-ICAM) hatte keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen den untersuchten Zelllinien. Da bei direktem Zell-Zell-Kontakt eine weitaus stärkere Down-Regulation beobachtet werden konnte, sind möglicherweise andere Adhäsionsmoleküle involviert. Scheinen Selektine und CD31 (PECAM – Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) zwar bei Interaktionen von PMN mit Endothelien eine wichtige Rolle zu spielen, so sind Einflüsse bei epithelialen Zell-Zell-Interaktionen bisher nicht festgestellt worden. Vielmehr sind wohl Proteoglykane und Protein-Komponenten von Zellbrücken bei Adhäsion und Migrationsprozessen von entscheidender Bedeutung.<sup>84</sup>

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass mit dem Zell-Überstand die Ergebnisse nicht bzw. nur inkomplett reproduzierbar waren. Möglicherweise sind Mediatoren involviert, die extrem kurzlebig sind und daher eine enge räumliche Nähe gegeben sein muss. Bestätigung findet diese Annahme in den Versuchsreihen, in welchen wir die Synthese von NO, einem sehr kurzlebigen Mediator, der enge Zellnähe benötigt,<sup>85</sup> unterbanden und so die Down-Regulierung antagonisieren konnten.



### IV.3 Suche nach möglichen Mediatoren der Down-Regulation

Nachdem der Nachweis für eine Einflussnahme der Epithelzellen auf granulozytäres Reaktionsverhalten erbracht war, versuchten wir, zugrunde liegende Ursachen zu bestimmen. Dazu wurde die Genese antiinflammatorischer Mediatoren der Epithelzellen inhibiert.

#### *Zytokine*

Im Rahmen der Mediatorsuche wurde ein möglicher Einfluss von Zytokinen in Betracht gezogen. Wir wissen, dass einige Zytokine einen inhibierenden Einfluss auf granulozytäre Funktionsweisen ausüben, wie z.B. Interleukin 10 (IL-10)<sup>86</sup> oder Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra),<sup>87</sup> diese aber de novo eine Proteinsynthese erfordern, also eines langen Synthese-Prozesses bedürfen. Eine solche Situation war aber unter unseren Versuchsbedingungen nicht gegeben, weshalb wir Zytokine als Mediatoren der Down-Regulation ausgeschlossen haben.

#### *Lipidmediatoren*

Zu den Lipidmediatoren mit bekannter antiinflammatorischer Wirkung gehören Prostaglandine wie PGE<sub>2</sub>, Prostaglandin D<sub>2</sub> und 15deoxy $\Delta^{12-14}$ prostaglandin J<sub>2</sub> sowie die Lipoxine. Prostaglandine induzieren hierbei über Prostaglandinrezeptoren intrazellulär erhöhte c-AMP-Level als second messenger<sup>88,89</sup> und können die Auflösung inflammatorischer Prozesse unterstützen.<sup>90</sup> Eine Hemmung der Prostaglandin- und Lipoxinsynthese über Indometacin und Acetylsalicylsäure als unspezifische Cyclooxygenaseinhibitoren bzw. MK886 als Lipoxygenaseinhibitor hatte jedoch keinen Einfluss auf den regulatorischen Effekt der Bronchialepithelzellen.

#### *Adenosin*

Adenosin ist ein endogenes Purinnukleosid, welches von Zellen als Teil des physiologischen Stoffwechsels produziert wird, und besitzt ein breites Spektrum von biologischen Aktivitäten, einschließlich der Modulation des Funktionsverhaltens von PMN. In vielen Studien konnte belegt werden, dass via Adenosinrezeptoren PMN-Funktionen wie Superoxidsynthese, Adhäsion, Phagozytose und auch die Synthese inflammatorischer Zytokine in Monozyten supprimiert werden. Auch im Rahmen von in vivo Studien wurde ein potenter antiinflammatorischer Effekt nachgewiesen.<sup>91</sup>

Einen solchen inhibitorischen Einfluss konnten wir in unseren Versuchsreihen mit exogenem Adenosin lediglich bei Stimulation mit fMLP, jedoch nicht bei Aktivierung mit A23 nachvollziehen. Im Koinkubationsmodell gelang es uns, durch Desaminierung mittels Adenosin-Desaminase den hemmenden Einfluss der Bronchialepithelzellen auf die Degranulierung teilweise (verminderte Supprimierung von 26 % auf 76 %) zu antagonisieren. Dass es nur zu einer teilweisen Restitution kam, ist nicht genau zu differenzieren und spiegelt wohl die Tatsache wider, dass Granulozyten als negativen Feedback-Mechanismus auch endogen Adenosin bilden, um unkontrollierte Aktivierung zu vermeiden.<sup>53,91</sup> Interessant ist auch der Befund, dass es bei der Superoxidgenese zu einer überschießenden Antagonisierung kam (von 58 % auf 249 % nach Desaminierung). Auch die Kontrollgruppe (PMN in Abwesenheit von B2B) mit alleiniger Gabe von Adenosin-Desaminase zeigte dieses Verhalten, was auf einen hemmenden Einfluss endogenen Adenosins hindeutet.

Auch der nichtselektive A1/A2-Rezeptorantagonist Theophyllin führte beim respiratory burst zu einer teilweisen Restitution von 32 % auf 57 % nach Antagonisierung, während bei den Messreihen zur Erfassung der Degranulierung mit einer Wiederherstellung auf 98 % der supprimierende Einfluss der B2B auf die Granulozyten nahezu aufgehoben werden konnte. Der unterschiedlich stark ausgebildete Effekt der Restitution ist möglicherweise mit einer differentiellen Affinität in Abhängigkeit mit der Konzentration zu den verschiedenen Adenosinrezeptoren zu erklären. FREDHOLM et al. konnten zeigen, dass der inhibitorische Einfluss von Adenosin auf den respiratory burst über Adenosin A<sub>2a</sub> Rezeptoren vermittelt wird, wobei in diesen Studien Theophyllin mit 30 µM in wesentlich höheren Konzentrationen zum Einsatz kam.<sup>92</sup> Wie BOUMA et al. berichteten, wird die Down-Regulation der Degranulierung dagegen über Adenosin A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> Rezeptoren vermittelt und auch sie waren in der Lage, mit Theophyllin diesen Einfluss zu antagonisieren.<sup>93</sup>

*Stickstoffmonoxid*

Stickstoffmonoxid spielt zum einen speziell bei der Steuerung granulözytärer Funktionen zum anderen aber auch bei komplexen Vorgängen im Immunsystem eine entscheidende Rolle. NO kann als eigenständiges Molekül toxisch auf Mikroben einwirken aber auch viele Funktionen von Immunzellen wie Makrophagen, T-Lymphozyten, Antigen-präsentierende Zellen, Mastzellen, natürliche Killerzellen und PMN beeinflussen.

Nach Applikation von inhalativem NO vermindert sich zum Beispiel die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der Lunge, es findet sich weniger IL-8 und es kommt unter inflammatorischen Bedingungen zu einer gesteigerten granulözytären Apoptose, was erklären könnte, weshalb diese Therapie zum Sistieren einer pulmonalen Inflammation beitragen kann.<sup>94</sup> Wir waren in der Lage, eine nahezu volle Aufhebung der B2B-vermittelten Supprimierung in fMLP-stimulierten PMN durch NO-Antagonismus zu erzielen. Mit dem NO-Synthase-Antagonisten L-NMMA erzielten wir eine Restitution beim respiratory burst von 38 % auf 89 %, was sich auch in der Arbeit von CATZ et al.<sup>95</sup> zeigte und konnten die supprimierte Degranulierung von 77 % auf 108 % anheben. Wie in der Literatur beschrieben setzt die schnelle Wirkung von NO über einen Anstieg des zyklischen GMP ein.<sup>96</sup> Eine Erhöhung des intrazellulären cGMP mittels des PDE5-Inhibitors Zaprinast führte in unseren Versuchsreihen dosisabhängig ebenfalls zu einer signifikanten Supprimierung des respiratory burst. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit der Arbeit von LEE et al.<sup>97</sup> CLANCY et al. postulierten zudem eine Reduktion der Superoxidgeneration via eines direkten Effektes auf die NADPH Oxidase. Dabei greift NO noch vor der Assoziation des Multienzymkomplexes in die Superoxidgenese ein.<sup>98</sup> Allerdings sind auch aktivierende Einflüsse von NO auf granulözytäre Funktionen beschrieben, wie zum Beispiel Chemotaxis und Adhäsion durch NO getriggert aber auch gebremst werden können. Diese paradoxen Eigenschaften sind noch nicht erklärt, aber vermutlich spielt die Konzentration von NO eine entscheidende Rolle, wobei ein niedriger Spiegel stimuliert, während hohe Dosen im Sinne eines negativen Feedbacks hemmen.<sup>99</sup> Auch die neutrophile Phagozytose wird durch NO beeinflusst und es konnte gezeigt werden, dass L-NMMA die Abtötung und Aufnahme von Staphylokokken herabsetzt, was sich mit L-Arginin wieder antagonisieren ließ.<sup>100</sup>

In der klinischen Routine findet inhalatives NO, unter anderem durch Dilatation der Pulmonalgefäße, im Rahmen der Behandlung von pulmonalem Hochdruck wie beim ARDS oder bei Ateminsuffizienz und Hypoxie bei Neugeborenen Anwendung. Daneben können Reperfusionsschäden in der Herz- und Gefäß-Therapie minimiert werden.

#### IV.4 Differenzierung der Induktion mit fMLP bzw. A23

Auffallend an unseren Ergebnissen war die Tatsache, dass sich nur die Hemmung in fMLP-stimulierten Granulozyten antagonisieren ließ, der regulatorische Einfluss durch A23 aber nicht, obwohl für beide Aktivatoren eine signifikante Reduktion des granulozytären Reaktionsverhaltens in B2B-PMN-Koinkubationen nachzuweisen war. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten bezüglich Aktivierung mit fMLP oder A23 ist der unterschiedliche Wirkmechanismus, der bei fMLP mit einem spezifischen PMN-Aktivator rezeptorabhängig ist, während das Ionophor A23 direkt an der Zellwand angreift und im Gegensatz zu fMLP auch direkt auf die Bronchialepithelzellen wirkt. Über fMLP werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren angesprochen, die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI-3K) aktivieren, welche wiederum Phosphatidylinositol(3,4,5)-Triphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) generieren, was einen Co-Faktor zu Aktivierung der NADPH-Oxidase darstellt. Zudem wirkt PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> auf die Proteinkinase C, die über Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung und Diacylglycerol (DAG) aktiviert wird und beim respiratory burst eine entscheidende Rolle spielt. Bei der Degranulierung bewirken unter anderem Phospholipase C über Inositol(1,4,5)-Triphosphat (InsP<sub>3</sub>), DAG und einen erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Spiegel die Sekretion von Granulakomponenten.<sup>101</sup> Eventuell induziert A23 auch in den Bronchialepithelien komplexe Signaltransduktions- und Mediator-Metabolismen, die nicht durch Interferieren mit einem einzelnen Signalmolekül (NO, Adenosin, Theophyllin) inhibiert werden können. Daher scheint auch in den Granulozyten die A23-abhängige Zellaktivierung nicht durch Adenosin beeinflussbar, wie die Versuche mit exogenem Adenosin zeigten.

### **IV.5 Steigerung der fMLP-induzierten granulozytären Degranulierung durch Alveolarepithelzellen – Prinzip der kooperativen Eicosanoidsynthese**

Analog zu den Versuchen mit Bronchialepithelzellen bezüglich des Reaktionsverhaltens der PMN untersuchten wir auch die Wechselwirkung zwischen Alveolarepithelzellen und PMN. Wir bestimmten auch in diesem Zusammenhang wiederum die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Elastase in den Zellüberstand. Dabei konnten wir den Unterschied herausarbeiten, dass die Alveolarepithelien bei fMLP-induzierter Aktivierung keinen hemmenden sondern einen aktivierenden Einfluss auf die Degranulierung ausüben.

Bei der Frage, ob direkter Kontakt benötigt wird, zeigte sich wiederum ein ähnliches Verhalten wie bei den B2B, mit stärkerem Einfluss bei direktem Zell-Zell-Kontakt.

Antagonisieren konnten wir diesen Effekt durch Einsatz des 5-LO-Antagonisten MK886. Dieser 5-Lipoxygenase-Inhibitor bedingt unter anderem die Sistierung der Leukotrienproduktion. Unser Ergebnis stellt sich daher konträr zur Arbeit von BROCK et al. dar, die den Alveolarepithelien keine 5-LO-Aktivität zusprechen.<sup>102</sup> Danach produzieren Alveolarepithelien LTB<sub>4</sub> vielmehr durch transzellulären Transport der z.B. granulozytären 5-LO-gebildeten Vorstufe LTA<sub>4</sub> und anschließende Aktivität eigener LTA<sub>4</sub>-Hydrolase. Das Prinzip der kooperativen Eicosanoidsynthese wurde auch von GRIMMINGER et al. entworfen, die zeigen konnten, dass die granulozytäre LTB<sub>4</sub>-Synthese in Koinkubation mit Alveolarmakrophagen massiv gesteigert wird.<sup>103</sup> Da LTB<sub>4</sub> per se über auto- und parakrine Mechanismen selbst ein potenter Aktivator der granulozytären Degranulierungsreaktion ist, könnte der steigernde Effekt der Alveolarepithelien auf die neutrophile Degranulierung durchaus durch das in Kokulturen vermehrt gebildete LTB<sub>4</sub> zurückzuführen sein. Ein Effekt der sich durch Hemmung der 5-Lipoxygenase mit MK886 aufheben ließ. Vielleicht bedingt in diesem Rahmen eine kurze Einwirkung von MK886 auf die PMN eine verminderte LTA<sub>4</sub>- und konsekutiv LTB<sub>4</sub>-Genese, wodurch der aktivierende Stimulus abfällt.

Die biologische Bedeutung unseres Befundes ist möglicherweise mit der Lokalisation der Alveolarepithelien zu begründen. Da sich aufgrund der anatomischen Gegebenheiten in den Alveolen sehr leicht inflammatorische Foki (Bakterien, Pilze) bilden können, sollen diese direkt von maximal aktiven Granulozyten in engem räumlichem Wirkungsbereich bekämpft werden.

## IV.6 Interpretation der Ergebnisse und Ausblick

Versucht man den physiologischen Nutzen für den Einfluss und die Down-Regulation der Granulozyten durch die Bronchialepithelzellen zu finden, so scheint die offensichtlichste Antwort ein Schutzmechanismus der Epithelien vor dem zerstörerischen Potential der Granulozyten zu sein. Für eine physiologische und effektive Wirkweise der Granulozyten ist das diffizile Gleichgewicht zwischen einer angemessenen oder überschießenden Aktivierung der destruktiven und antimikrobiellen Eigenschaften von grundlegender Bedeutung. Störungen können schwere Krankheitszustände wie z.B. beim ARDS oder andere entzündliche Lungenerkrankungen hervorrufen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wie bereits aktiviertes Epithel auf die Funktionen der Granulozyten Einfluss nimmt. Für zukünftige Arbeiten ist sicherlich interessant zu untersuchen, ob unter solchen Bedingungen eine ähnliche Hemmung noch gegeben ist. Bricht dieser Mechanismus nämlich zusammen, so ist mit einer überbordenden granulozytären Reaktion zu rechnen, welche die physiologische und hilfreiche Aktivität weit überschreitet. Auch der unterschiedliche Einfluss von Bronchial- und Alveolarepithel bei fMLP-induzierter Degranulierung, Hemmung durch bronchiales und gesteigerte Elastasefreisetzung durch alveolares Epithel, wirft interessante Fragen auf. Auf dem Weg in die Alveolen wäre das Potential der PMN möglicherweise schon verbraucht, wenn es zu einer ungehinderten Aktivierung bereits im Bronchialsystem käme. Durch den hemmenden Einfluss der B2B bleibt dagegen zumindest die Fähigkeit der Elastasefreisetzung bis zum Zielort, den Alveolen, erhalten und kann dort dann maximal stimuliert werden (siehe Abbildungen 11a+b).

Kritisch betrachten sollte man in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass die A549-Zellen aus einer Tumorzelllinie gewonnen werden und ein nicht physiologischer Effekt im Sinne einer Steigerung der Degranulierung möglicherweise in diesem Umstand begründet liegt. Patienten mit Bronchialkarzinomen bzw. Tumorpatienten zeigen häufig inflammatorische Prozesse und Pneumonien. Zusätzliche Untersuchungen sind nötig, um hier eine weiterführende Differenzierung postulieren zu können.

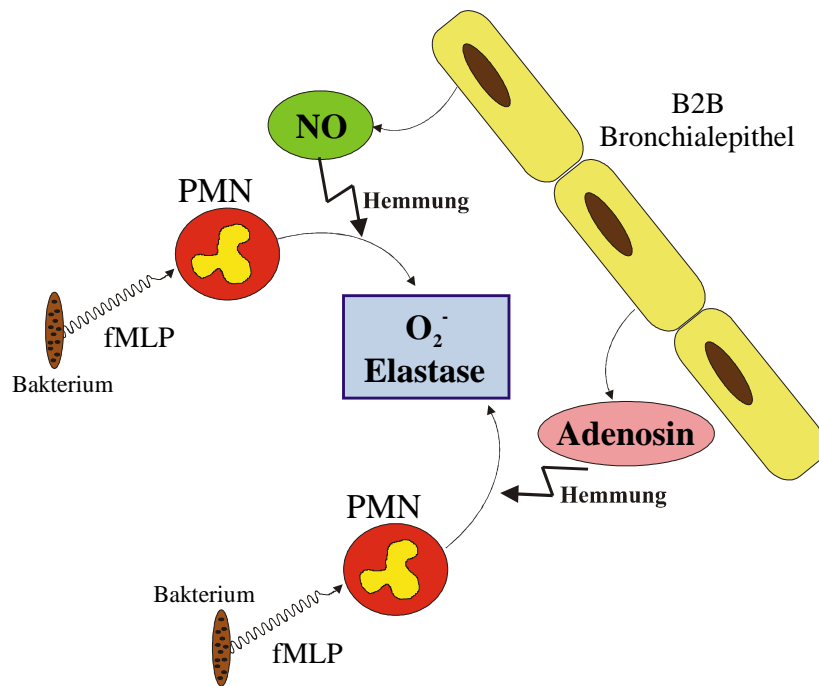


Abbildung 11a) Hemmung inflammatorischen Granulozytenverhaltens durch Bronchialepithelien.

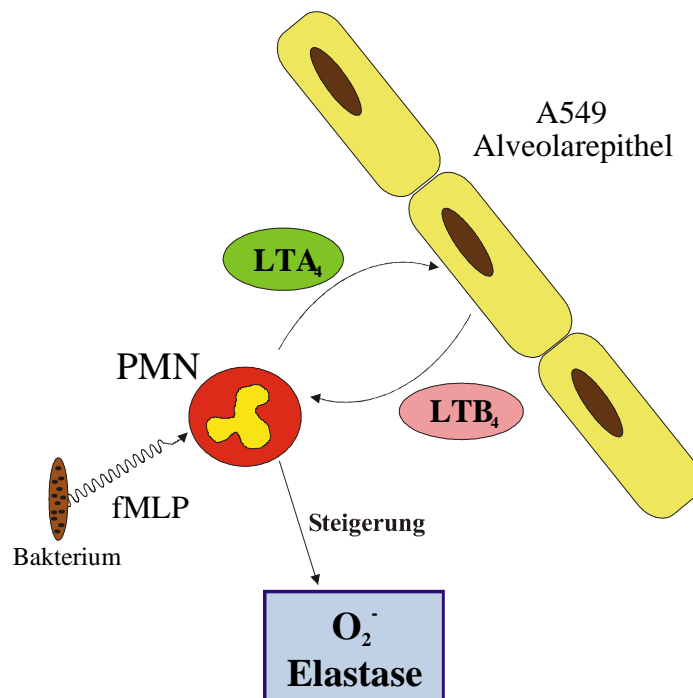


Abbildung 11b) Steigerung inflammatorischen Granulozytenverhaltens durch Alveolarepithelien/  
Bronchialkarzinomzellen

## V Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand der Einfluss bronchialer und alveolarer Epithelzellen auf das Reaktionsverhalten neutrophiler Granulozyten. Im Rahmen vieler inflammatorischer Prozesse und Krankheitsbilder spielen PMN eine entscheidende Rolle. Den Einfluss der Epithelzellen auf das Reaktionsverhalten der PMN untersuchten wir im Hinblick auf die Aktivierung destruktiver granulozytärer Zellreaktionen. Wir bestimmten die Freisetzung von Sauerstoffradikalen (respiratory burst) und Elastase (Degranulierung) in den jeweiligen Zellüberstand und konnten feststellen, dass Bronchialepithelzellen eine generelle Hemmung dieser Zellreaktionen hervorrufen. Dabei konnten wir zeigen, dass ein ICAM-unabhängiger, direkter Zell-Zell-Kontakt einen weitaus größeren Einfluss der Epithelzellen zuließ, als Stimulationen in Epithel-geprimter Nährlösung. Die pharmakologische Inhibierung der Genese antiinflammatorischer Mediatoren durch die Bronchialepithelzellen ergab sowohl bei Blockade der Cyclooxygenase als auch der 5-Lipoxygenase keine Änderung im granulozytären Verhalten. Durch Antagonisierung der Stickstoffmonoxidgeneration konnten wir allerdings den regulatorischen Einfluss der Bronchialepithelzellen bei fMLP-induzierter PMN-Aktivierung aufheben. NO mit seinen in der Literatur beschriebenen paradoxen Eigenschaften, scheint wohl je nach Konzentrationsgefüge aktivierenden bzw. hemmenden Einfluss zu nehmen. Des Weiteren konnten wir belegen, dass auch exogenes Adenosin bei den Regulationsvorgängen eine wichtige Rolle spielt! Zum einen hemmt bei Induktion mit fMLP exogenes Adenosin den respiratory burst und die Degranulierung, zum anderen konnten wir in Kokulturen den inhibitorischen Effekt der Bronchialepithelien durch Adenosin-Desaminase aufheben.

Zum Vergleich des Einflusses von Bronchial- und Alveolarepithel auf PMN wurden von uns auch Alveolarepithelzellen untersucht. Interessanterweise zeigte sich, dass bei fMLP-induzierter Degranulierung eine gesteigerte Aktivität beobachtet werden konnte. Inhibierung der Cyclooxygenase sowie der Thromboxangeneese nahmen keinen Einfluss auf dieses den B2B gegensätzliche Verhalten, jedoch wurde nach Blockade der 5-Lipoxygenase auch hier der beobachtete Einfluss der Alveolarepithelien auf die Granulozyten antagonisiert.

Weshalb sich die beiden Pulmonalepithelien unterschiedlich verhalten ist unklar. Möglicherweise sollen Granulozyten in den Bronchien noch keine Aktivierung erfahren, sondern erst am Ort des Geschehens, nämlich in den Alveolen, um dort inflammatorischen Foki mit unvermindertem Potential zu begegnen.



## VI Anhang

### VI.1 Zusammenfassung (englisch)

The aim of the present study was to investigate the influence of bronchial und alveolar epithelial cells on the behaviour of PMN. In the context of many inflammatory processes and disease patterns PMN play a crucial role. The influence of the epithelial cells on the behaviour of PMN was investigated with regard to the activation of destructive granular cell-reactions. We assessed the release of oxygen radicals (respiratory burst) and elastase (degranulation) into the respective supernatant and were able to establish that bronchial epithelial cells excite a general inhibition of these cell-reactions. Thereby we could show, that an ICAM-independent direct cell-cell-contact allowed a greater influence of the epithelial cells than stimulation in epithelial-primed medium. The pharmacological inhibition of the genesis of antiinflammatory mediators by bronchial epithelial cells revealed no change of the granular behaviour regardless of blocking the cyclooxygenase or the 5-lipoxygenase. But by antagonizing the nitrate monoxide generation we were able to neutralize the regulatory influence of bronchial epithelial cells on PMN-activation induced by fMLP. As described in the literature NO possesses paradox properties and it seems activating or inhibiting influence depends on the concentration. Furthermore we could demonstrate that exogenous adenosine also plays an important role in the regulation processes. Firstly respiratory burst and degranulation are inhibited by adenosine when induced with fMLP and secondly we were able to neutralize in co-cultures the inhibitory effect of the bronchial epithelial cells by adenosine desaminase.

For comparison of the influence of bronchial and alveolar epithelial cells on PMN we also analyzed alveolar epithelial cells. Interestingly we established that fMLP induced degranulation caused an increased activation. Inhibition of the cyclooxygenase as well as the thromboxane genesis had no influence on this to the B2B oppositional behaviour. But blocking the 5-lipoxygenase antagonized the observed influence of the alveolar epithelial cells on the PMN.

The reason for this different behaviour of the two pulmonal epithelials is unknown. Maybe there should be no first PMN activation in bronchial segments but in more attractive alveolar parts by what especially there a most efficient activity against inflammatory foci is possible.

## VI.2 Liste verwendeter Abkürzungen

A23	Calciumionophor A23187
AA	Arachidonsäure
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster Determinanten
cGMP	zyklisches Guanylmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
FiO <sub>2</sub>	Sauerstoffgehalt des Inspirationsgases
fMLP	N-formyl-L-Methionin-L-Leucin-L-Phenylalanin
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
H/H <sup>+/+</sup>	Hanks/Hepes-Puffer mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LDH	Laktatdehydrogenase
L-NMMA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin
LO	Lipoxygenase
LK	Leukotrien
MK886	5-LO-Inhibitor[L-663,536(3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5- isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid)
NADPH-Oxidase	Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Nitric Oxide Synthase
paO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	phosphat-buffered saline
PDE	Phosphodiesterase
PG	Prostaglandin
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
SOD	Superoxiddismutase
TNF	Tumor Nekrose Faktor

### VI.3 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 190: 117-125, 2000.
- <sup>2</sup> Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2:319-23.
- <sup>3</sup> Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American-European-Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *AM J Respir Crit Care Med* 1994;129:818-24.
- <sup>4</sup> Fein AM, Calalang-Colucci MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin* 2000;16:289-317.
- <sup>5</sup> Pratt PC, Vollmer RT, Shelburen JD, Crapo JD. Pulmonary morphology in a multihospital collaborative extracorporeal membrane oxygenation project. I. Light microscopy. *Am J Pathol* 1979;95:191-214.
- <sup>6</sup> Pugin J, Verghese G, Widmer M-C, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1999;27:304-312.
- <sup>7</sup> Ware LB, Matthay MA. Maximal alveolar epithelial fluid clearance in clinical acute lung injury: an excellent predictor of survival and the duration of mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:Suppl:A694. abstract.
- <sup>8</sup> Modelska K, Pittet JF, Folkesson HG, Broaddus VC, Matthay MA. Acid-induced lung injury: protective effect of anti-interleukin 8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1450-6.
- <sup>9</sup> Sznjader JI. Strategies to increase alveolar epithelial fluid removal in the injured lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1441-2.
- <sup>10</sup> Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, et al. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1843-50.
- <sup>11</sup> Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, et al. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999;104:743-50.
- <sup>12</sup> Meduri GU, Chinn AJ, Leeper KV, Wunderink RG, Tolley E, Winer-Muram HT, Khare V, Eltorkey M. Corticosteroid rescue treatment of progressive fibroproliferation in late ARDS. Patterns of response and predictors of outcome. *Chest* 1994;105:1516-27.
- <sup>13</sup> Matthay MA, Broaddus VC. Fluid and hemodynamic management in acute lung injury. *Semin Respir Crit Care Med* 1994;15:271-88.
- <sup>14</sup> Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:113-122.
- <sup>15</sup> Pittet JF, MacKersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1187-205.
- <sup>16</sup> Smith JA. Neutrophils, host defense and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 1994;153:1271-80.
- <sup>17</sup> Ali H, Haribabu B, Richardson RM, Snyderman R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *Med Clin North Am* 1997 Jan;81(1):1-28.
- <sup>18</sup> Role Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *J FASEB* 1994;8:504-12.

- <sup>19</sup> Aldridge AJ. Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. *Eur J Surg* 2002;168:204-14.
- <sup>20</sup> Puneet P, Moochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 Jan;288(1):L3-L15.
- <sup>21</sup> Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997;Vol 89,No10:3503-21.
- <sup>22</sup> Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-76.
- <sup>23</sup> Borregaard N. Development of neutrophil granule diversity. *Ann N Y Acad Sci* 1997 Dec15;832:62-8.
- <sup>24</sup> Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111:383-89.
- <sup>25</sup> Elsbach P. The bactericidal/permeability increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J Leukocyte Biol* 1998;64:14-18.
- <sup>26</sup> Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukocyte Biol* 1999;65:137-50.
- <sup>27</sup> Ashitani J, Mukae H, Ihiboshi H, Taniguchi H, Mashimoto H, Nakaz M, Matsukura S. Defensin in plasma and in bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute respiratory distress syndrome. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1996 Dec;34(12):1349-53.
- <sup>28</sup> Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Løllike K, Dahlgren C, Borregaard N. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol* 1995;154:4157-65.
- <sup>29</sup> Oram JD, Reiter B. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochim Biophys Acta* 1968;170:351-65.
- <sup>30</sup> Chapple DS, Mason DJ, Joannou CL, Odell EW, Gant V, Evans RW. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escheria coli* serotype 0111. *Infect Immun* 1998;66:2434-40.
- <sup>31</sup> Murav`ev RA, Fomina VA, Rogovin VV. Gelatinase of the neutrophil granulocytes. *Izv Akad Nauk Ser Biol* 2003 Jul-Aug;(4):389-94.
- <sup>32</sup> Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of MAC-1 ( $\alpha_m\beta_2$ ) in human neutrophils. *J Clin Invest* 1993;92:1467-76.
- <sup>33</sup> Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003 Nov;5(14):1317-27.
- <sup>34</sup> Baldrige CW, Gerhard RW. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol* 1933;103:235-236.
- <sup>35</sup> Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002 Sep;59(9):1428-59.
- <sup>36</sup> Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004 Feb;16(1):42-7.
- <sup>37</sup> Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, Evans TW. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J* 1998 Mar;11(3):745-57.
- <sup>38</sup> Hiemstra PS. Epithelial antimicrobial peptides and proteins: their role in host defence and inflammation. *Paed Resp Rev* 2001;2:306-310.
- <sup>39</sup> Martin E, Ganz T, Lehrer RI. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol* 1995;58:128-136.

- <sup>40</sup> Diamond G, Legarda D, Ryan LK. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immun Rev* 2000;173:27-38.
- <sup>41</sup> Singh PK, et al. Production of  $\beta$ -defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14961-66.
- <sup>42</sup> Yang D, Chertov O, Bykovskaia S, Chen Q, Buffo M, Shogan J, Anderson M, Schroder J, Wang J, Howard O, Oppenheim J.  $\beta$ -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999;286:525-28.
- <sup>43</sup> Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Resp Res* 2000;1:141-50.
- <sup>44</sup> Stritz I, et al. IL-4 induces ICAM-1 expression in human bronchial epithelial cells and potentiates TNF- $\alpha$ . *Am J Physiol* 1999;277:L58-L64.
- <sup>45</sup> Conejo Garcia JR, Krause A, Schluz S, Rodriguez-Jimenez F-J, Klüver E, Adermann K, et al. Human  $\beta$ -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 2001;15:1819-21.
- <sup>46</sup> YANG D, Chertov O, Oppenheim JJ, Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J leukoc Biol* 2001;69:691-97.
- <sup>47</sup> Khair OA, Davies RJ, Devalia JL. Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *J Eur Respir* 1996;9:1913-22.
- <sup>48</sup> Rahman I. Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochem Pharmacol* 2002;64:935-42.
- <sup>49</sup> Rose F, Dahlem G, Guthmann B, Grimminger F, Maus U, Hänze J, Dummer N, Grandel U, Seeger W, Ghofrani HA. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by *S.aureus*  $\alpha$ -toxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L207-14.
- <sup>50</sup> Le Moine O, Stordeur P, Schandené L, Marchant A, de Groote D, Goldman M, Devière J. Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J Immunol* 1996 Jun 1;156(11):4408-14.
- <sup>51</sup> Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Sychala J, Boucher RC. Ecto 5'-Nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 2003 April;278(15):13468-79.
- <sup>52</sup> Kitakaze M, Hori M. Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure. *Expert Opin Investig Drugs* 2000 Nov;9(11):2519-35.
- <sup>53</sup> Zalavary S, Bengtsson T. Modulation of the chemotactic peptide- and immunoglobulin G-triggered respiratory burst in human neutrophils by exogenous and endogenous adenosine. *Eur J Pharmacol* 1998 Aug 7;354(2-3):215-25.
- <sup>54</sup> Bouma MG, Jeunhomme TM, Boyle DL, Dentener MA, Voitenok N, den Wildenberg FA, Buurman WA. Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J Immunol* 1997 Jun 1;158(11):5400-8.
- <sup>55</sup> Krump E, Borgeat P. Adenosine. An endogenous inhibitor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Adv Exp Med Biol* 1999;447:107-15.
- <sup>56</sup> Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 2001:1397-1406.
- <sup>57</sup> Watkins DN, Lewis RH, Basclain KA, Fisher PH, Peroni DJ, Garlepp MJ, Thompson PJ. Expression and localization of the inducible isoform of nitric oxide synthase in nasal polyp epithelium. *Clin Exp Allerg* 1998;28:211-19.

- <sup>58</sup> Dedon PC, Tannenbaum SR. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem Biophys* 2004 Mar 1;423(1):12-22.
- <sup>59</sup> Kolodziejcki PJ, KOO JS, Eissa NT. Regulation of inducible nitric oxide synthase by rapid cellular turnover and cotranslational down-regulation by dimerization inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 Dec 28; 101(52):18141-6. Epub 2004 Dec 15.
- <sup>60</sup> Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. *Nat Rev Immunol* 2002;2:787-95.
- <sup>61</sup> Grimminger F, Sibelius U, Seeger W. Amplification of LTB<sub>4</sub> generation in AM-PMN cocultures: transcellular 5-lipoxygenase metabolism. *Am J Physiol* 1991 Aug;261(2 Pt 1):L195-203.
- <sup>62</sup> Serhan CN. Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. *Biochim Biophys Acta* 1212:1-25.
- <sup>63</sup> Clarkson MR, McGinty A, Godson C, Brady HR. Leukotrienes and lipoxins: lipoxygenase-derived modulators of leukocyte recruitment and vascular tone in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:3043-51.
- <sup>64</sup> Serhan CN, Sheppard KA. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transforamtion of leukotriene A<sub>4</sub> by platelet 12-lipoxygenase *in vitro*. *J Clin Invest* 85:772-80.
- <sup>65</sup> Edenius C, Kumlin M, Bjork T, Anggard A, Lindgren JA. Lipoxin formation in human nasal polyps and bronchial tissue. *FEBS Lett* 1990;272:25-28.
- <sup>66</sup> Clish CB, O'Brien JA, Gronert K, Stahl GL, Petasis NA, Serhan CN. Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8247-52.
- <sup>67</sup> Kantarci A, van Dyke TE. Lipoxins in chronic inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(1):4-12.
- <sup>68</sup> Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's biochemistry*. 25<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill 1999.
- <sup>69</sup> Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunol* 2001;2:612-19.
- <sup>70</sup> Derek W, Gilroy DW, Cloville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Medicine* 1999;5(6):698-701.
- <sup>71</sup> Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the  $\beta_2$ -integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996; 82:1225-35.
- <sup>72</sup> Zalavary S, Grenegard M, Stendahl O, Bengtsson T. Platelets enhance Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization. *J Leukoc Biol* 1996; 60:58-68.
- <sup>73</sup> Bengtsson T, Frydén A, Zalavary S, Whiss PA, Orselius K, Grenegard M. Platelets enhance neutrophil locomotion: evidence for a role of P-selectin. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59:439-50.
- <sup>74</sup> Cettour-Rose P, Nguyen TXK, Serrander L, Kaufmann MT, Dayer JM, Burger D, Roux-Lombard P. T cell contact-mediated activation of respiratory burst in human polymorphnuclear leukocytes is inhibited by high-density lipoproteins and involves CD18. *J Leukoc Biol* 2005;77:52-58.
- <sup>75</sup> Sala A, Folco G. Neutrophils, endothelial cells and cysteinyl leukotrienes: a new approach to neutrophil-dependent inflammation? *Biochem Biophys Res Commun* 2001 May 25;283(5):1003-6.
- <sup>76</sup> Ginis I, Faller DV. Protection from apoptosis in human neutrophils is determined by the surface of adhesion. *Am J Physiol* 1997 Jan;272:C295-309.

- <sup>77</sup> Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 2005 Aug;78(2):325-37.
- <sup>78</sup> Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scan J Immunol* 1976;(S5):9-15.
- <sup>79</sup> Kramps J.A. L-pyroglutamyl-L-propyl-L-valine-p-nitro-anilide, a highly specific substrate for granulocyte elastase. *Scan J Clin Lab Invest* 1983;43: 427-32.
- <sup>80</sup> Cohen H.J, Chovaniec ME. Superoxide-generation by digitonin-stimulated guinea-pig granulocytes. *J Clin Invest*;61:1081-87.
- <sup>81</sup> Minoguchi K, Adachi M, Thromboxane A2 synthase inhibitor and receptor antagonist. *Nippon Rinsho* 2001 Oct;59(10):1986-91.
- <sup>82</sup> Martin TR, Pistorese BP, Hudson LD, Maunder RJ. The function of lung and blood neutrophils in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1991;144, 254-62.
- <sup>83</sup> Beck-Schimmer B, Mdjdpour C, Kneller S, Ziegler U, Pasch T, Wüthrich RP, Ward PA, Schimmer RC. Role of alveolar epithelial ICAM-1 in lipopolysaccharide-induced lung inflammation. *Eur Respir J* 2002;19:1142-50.
- <sup>84</sup> Zen k, Parkos CA. Leukocyte-epithelial interactions. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Oct;15(5):557-64.
- <sup>85</sup> Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2001 Aug;1(8):1397-406.
- <sup>86</sup> Sibelius U, Hattar K, Hoffmann S, Mayer K, Grandel U, Schenkel A, Seeger W, Grimminger F. Distinct pathways of lipopolysaccharide priming of human neutrophil respiratory burst: role of lipid mediator synthesis and sensitivity to interleukin-10. *Crit Care Med* 2002 Oct;30(10):2306-12.
- <sup>87</sup> Goodman RB, Pugin J, Lee JS, Matthay MA. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003 Dec;14(6):523-35.
- <sup>88</sup> Hattar K, Grandel U, Bickenbach A, Schwarting A, Mayet WJ, Bux J, Jessen S, Fischer C, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U. Interaction of antibodies to proteinase 3 (classic anti-neutrophil cytoplasmic antibody) with human renal tubular epithelial cells: impact on signaling events and inflammatory mediator generation. *J Immunol* 2002 Mar 15; 168(6):3057-64.
- <sup>89</sup> Yamane H, Sugimoto Y, Tanaka S, Ichikawa A. Prostaglandin E(2) receptors, EP2 and EP4, differentially modulate TNF-alpha and IL-6 production induced by lipopolysaccharide in mouse peritoneal neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Nov 11;278(1):224-8.
- <sup>90</sup> Bandeira-Melo C, Serra MF, Diaz BL, Cordeiro RSB, Silva PMR, Lenzi HL, Bakhle YS, Serhan CN, Martins MA. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 and lipoxin A4 accelerate resolution of allergic edema in *Angiostrongylus costaricensis*-infected rats: relationship with concurrent eosinophilia. *J immunol* 2000 Jan 15;164(2):1029-36.
- <sup>91</sup> Krump E, Picard S, Mancini J, Borgeat P. Suppression of leukotriene B<sub>4</sub> biosynthesis by endogenous Adenosine in ligand-activated human neutrophils. *J Exp Med* 1997 Oct 20;186(8):1401-06.
- <sup>92</sup> Fredholm BB, Zhang Y, van der Ploeg I. Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996 Aug-Sep;354(3):262-7.
- <sup>93</sup> Bouma MG, Jeunhomme TM, Boyle DL, Dentener MA, Voitenok N, Wildenberg FA, Buurman WA. Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J Immunol* 1997 Jun 1;158(11):5400-8.
- <sup>94</sup> El Kebir D, Taha R, Hubert B, Gauvin D, Gangal M, Blaise G. The anti-inflammatory effect of inhaled nitric oxide on pulmonary inflammation in a swine model. *Can J Physiol Pharmacol* 2005 Mar;83(3):252-8.

- <sup>95</sup> Catz SD, Carreras MC, Poderoso JJ. Nitric oxide synthase inhibitors decrease human polymorphnuclear leukocyte luminol-dependent chemiluminescence. *Free Radical Biol Med* 1995;19:741-8.
- <sup>96</sup> Moilanen E, Vuorinen P, Kankaanranta H, Metsa-Ketela T, Vapaatalo H. Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphnuclear leukocyte functions. *Br. J Pharmacol* 1993;109:852-8.
- <sup>97</sup> Lee DK, Faunce D, Henry D, Sturm RJ, Rimele T. Neutrophil-derived relaxing factor relaxes vascular smooth muscle through a cGMP-mediated mechanism. *Life Sci* 1990;46(21):1531-8.
- <sup>98</sup> Clancy RM, Leszczynska Piziak J, Abramson, SB. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1992;90:1116-21.
- <sup>99</sup> Armstrong R. The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation. *Int Immunopharmacology* 2001;1501-12.
- <sup>100</sup> Malawista SE, Montgomery RR, van Blaricom G. Killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasts. A new microbicidal pathway for polymorphnuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1992;90:631-6.
- <sup>101</sup> Wymann MP, Sozzani S, Altruda F, Mantovani A, Hirsch E. Lipids on the move: phosphoinositide 3-kinases in leukocyte function. *Immunol Today* 2000 Jun;21(6):260-4.
- <sup>102</sup> Brock TG, Lee YJ, Maydanski E, Marburger TL, Luo M, Paine R 3<sup>rd</sup>, Peters-Golden M. Nuclear localization of leukotriene A4 hydrolase in type II alveolar epithelial cells in normal and fibrotic lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 Aug;289(2):L224-32. Epub 2005 Apr 1.
- <sup>103</sup> Grimminger F, Kreuzler B, Schneider U, Becker G, Seeger W. Influence of microvascular adherence on neutrophil leukotriene generation. Evidence for cooperative eicosanoid synthesis. *J Immunol* 1990 Mar 1;144(5):1866-72.



## VI.4 Erklärung zur Durchführung der Dissertation

Ich, Michael Ludwig, erkläre:

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

## VI.5 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Michael Ludwig
Geburtsdatum	17.06.1974
Geburtsort	Lich
Familienstand	ledig

### Schulbildung

1980 – 1984	Grundschule Lützellinden (Giessen)
1984 – 1990	Brüder-Grimm-Schule Klein Linden (Giessen)
1990 – 1993	Liebigsschule Giessen (Abschluss Abitur)

### Zivildienst

1993 – 1994	Rettungsdienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe e.V. KV Giessen
-------------	--

### Hochschulbildung

1994 – 1997	Studium der Sportwissenschaft an der Justus-Liebig-Universität Giessen
1996 – 2002	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen

### Berufliche Weiterbildung

1997	Ausbildung zum Rettungssanitäter
2003 – 2004	Arzt im Praktikum in der Abteilung Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Giessen
seit 2004	Assistenzarzt in der Abteilung Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Giessen

## VI.6 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung der Labors und der finanziellen Mittel, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Im Besonderen danke ich meiner Betreuerin Dr. Katja Hattar für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und tolle Unterstützung und die geduldige Einführung in die experimentellen Techniken und wissenschaftliches Arbeiten. Ihre Anregungen und beständige Auseinandersetzung mit dem Thema bildeten die Grundlage für die Entstehung dieser Promotion.

Für die freundliche Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft möchte ich ein großes Dankeschön an die im Labor tätigen MTA Karin Fietzner und Annette Tschuschner aussprechen.

Den vielen freiwilligen Blutspendern, ohne deren Teilnahme diese wissenschaftlichen Versuche nicht zustande gekommen wären, danke ich für die Bereitschaft, mir bei der Erstellung dieser Arbeit zur Verfügung gestanden zu haben.

Bei meinen Eltern, vor allem bei meiner Mutter, sowie bei meiner Fine will ich mich ganz besonders und sehr herzlich für die stetige Motivierung und so viel Verständnis und Unterstützung bedanken. Ebenso noch bei meiner Schwester Christina für die tollen Abbildungen in dieser Arbeit und die Zeit, die sie für deren Fertigstellung investiert hat.