

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Der Einfluss von Weizen Amylase-Trypsin-Inhibitoren auf die Effektorfunktionen
Neutrophiler Granulozyten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Johannes Eric Dobelmann
aus Kassel

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
1. Gutachter: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
2. Gutachter: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Tag der Promotion: 12.07.2022

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	V
II.	Abbildungsverzeichnis.....	VI
III.	Tabellenverzeichnis	VI
1	Einleitung und Zielsetzung der Dissertation	1
2	Literaturdiskussion	4
2.1	Neutrophile Granulozyten – Teile der angeborenen Immunantwort	4
2.1.1	Auswanderung und Aktivierung	4
2.1.2	PMN–Effektorfunktionen	6
2.1.3	Toll-like Rezeptoren – Schnelle Immunantwort dank Mustererkennung ..	8
2.2	Glutenunverträglichkeit – zwischen Trend und Krankheit.....	10
2.2.1	Definition der Zöliakie	10
2.2.2	NCGS – Trend oder reales Problem?.....	13
2.3	α -Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs).....	19
3	Material und Methoden.....	25
3.1	Methoden	25
3.1.1	Isolation der Neutrophilen Granulozyten aus Spender-Vollblut	25
3.1.2	Inhibitor-Behandlung und Stimulation der aufgereinigten PMN	25
	Für die folgenden Versuche wurden PMNs in technischen Duplikaten auf einer 96-Well-Platte angesetzt, aktiviert und die Effektorfunktionen analysiert.	25
3.1.3	Herstellung von Proteinlysaten aus aktivierten PMN	27
3.1.4	SDS Gel-Elektrophorese und Western Blot-Analyse	27
3.1.5	Durchflusszytometrie (FACS)	29
3.1.6	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	29
3.1.7	Bestimmung der Effektorfunktionen von Neutrophilen Granulozyten (PMN) 30	
3.2	Material	32
3.2.1	Spenderkollektiv	32

3.2.2	Versuchsräumlichkeiten.....	32
3.2.3	Verwendete Materialien	32
3.2.4	Gerätschaften	38
3.2.5	Auswertung und statistische Methoden	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Demografische Daten des Spenderkollektivs.....	40
4.2	Auswirkungen von Weizen Amylase-Trypsin-Inhibitoren auf die Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten.....	40
4.3	Hitzebehandlung von ATIs reduziert die Aktivierung von Granulozyten.....	44
4.4	ATIs aktivieren Granulozyten teilweise TLR4-unabhängig.....	46
4.5	Aktivierende Effekte von ATI auf PMN sind teilweise durch Antibiotika verhinderbar.....	48
4.6	ATIs im Western-Blot	50
4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51
5	Diskussion.....	52
5.1	Amylase-Trypsin-Inhibitoren beeinflussen PMN Effektorfunktionen in vitro ..	52
5.2	ATIs aktivieren Neutrophile Granulozyten teilweise TLR4-unabhängig.....	58
5.3	Der Einfluss von Amylase-Trypsin-Inhibitoren auf PMN Signalwege	61
5.4	Mögliches Management ATI-induzierter gastrointestinaler Beschwerden	62
6	Zusammenfassung.....	65
7	Literaturverzeichnis	66

I. Abkürzungsverzeichnis

AI	Amylase-Inhibitor
APC	antigenpräsentierende Zelle
ATI	Amylase-Trypsin Inhibitoren
BAL	bronchoalveoläre Lavage
CD	Cluster of Differentiation
CR	Komplementrezeptor
DC	antigenpräsentierende Zelle
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FODMAPs	fermentierbare Oligo-, Di- und Monosaccharide sowie Polyole
GDP	Guanosindiphosphat
hiATI	hitzebehandelte ATI
HLA-DQ2	Human Leukocyte Antigen-DQ2
HLA-DQ8	Human Leukocyte Antigen-DQ8
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	Mittlerer Fluoreszenz-Intensität
MICA	MHC I Polypeptid Sequenz A
MPO	Myeloperoxidase
NCGS	non-celiac-gluten-sensitivity
NETs	neutrophil extracellular traps
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMN	polymorphkerniger Leukozyt
RT	Raumtemperatur
SFI	Spezifischer Fluoreszenz-Index /-Intensität
STPI	Spielberger State Trait Personality Inventory
TG2	Transglutaminase 2
TI	Trypsin-Inhibitor
TLR	Toll-like Rezeptoren
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VAS	Visuelle Analog Skala
WASI	wheat-amylase subtilisin inhibitor
WCI	wheat chymotrypsin inhibitor
WDAI	wheat dimeric AI
WMAI	wheat monomeric AI
WTAI	wheat tetrameric AI

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung der NADPH-Oxidase in Zusammenwirken mit Cytochrom b₅₅₈

Abbildung 2: Humane TLRs und ihre Liganden

Abbildung 3: Histologischer Befund einer Dünndarmbiopsie, Marsh 0-4

Abbildung 4: Dermatitis herpetiformis Duhring

Abbildung 5: Entwicklung der Beschwerdesymptomatik unter Gluten oder Placebo

Abbildung 6: Darstellung der Symptomatik anhand einer Visuellen Analogskala (VAS)

Abbildung 7: Eosinophile und lymphozytäre Colon-Infiltrate

Abbildung 8: Übersicht über die Anordnung 13 verschiedener ATIs im Baumdiagramm

Abbildung 9: Prozentuale Verteilung von α -Amylase/Trypsin Inhibitoren (ATIs) im gewöhnlichen Weizen der Sorte Butte 86

Abbildung 10: Übersicht über die Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten

Abbildung 11: Veränderte Effektorfunktionen nach Hitzebehandlung von ATIs

Abbildung 12: Veränderte Effektorfunktionen nach TLR4-Blockade der PMN

Abbildung 13: Veränderte Effektorfunktionen nach antibiotischer Behandlung

Abbildung 14: ATIs im Western Blot

Abbildung 15: IL-8 Expression in Abhängigkeit der ATI-Konzentration im Mäusefutter

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erhebung des STPI mit $p < 0,05$ für Gluten

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen α -Amylase/Trypsin Inhibitoren (ATIs) im Weizen

Tabelle 3: Auswahl an verwendeten FACS-Antikörpern

Tabelle 4: Auswahl an verwendeten Western Blot Antikörpern

1 Einleitung und Zielsetzung der Dissertation

Der Weizen gehört menschheitsgeschichtlich betrachtet, noch nicht lange zu unseren Nahrungsmitteln [seit dem Neolithikum, vor ca. 12000 Jahren (6)]. Heutzutage ist er aus der Ernährung nicht mehr wegzudenken und zählt zu den Grundnahrungsmitteln der Menschheit. Zudem werden Weizenprodukte vielseitig in der Lebensmittelindustrie verwendet und vielen Fertigprodukten beigelegt.

Der zunehmende Konsum von Weizenprodukten korreliert stark mit der Zunahme verschiedener Erkrankungen, wie zum Beispiel der Weizenallergie und insbesondere der Zöliakie (7).

Die Zöliakie ist eine durchaus verbreitete Erkrankung des Dünndarms, die durch das in der Nahrung enthaltene Gluten verursacht wird und ca. 1% der Weltbevölkerung betrifft (8). Das Weizengluten zählt zu einer Familie größtenteils wasserunlöslicher Proteine und wird unterteilt in Gliadine und Glutenine, allerdings enthält es auch andere Proteine wie wasserlösliche Albumine sowie salzlösliche Globuline (7, 9).

Aufgrund ihrer ungewöhnlichen Struktur, die sich vor allem in Form hoher Anteile von Prolin und Glutamin äußert, sind Proteine aus Weizengluten teilweise resistent gegen Verdauungsenzyme. Somit entstehen bei der Verdauung von Gluten immer einige Anteile unverdauter Peptide, die immunogen wirksam sind. Diese Peptide binden an das Lymphozyten-Antigen HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 (das Vorhandensein dieses Antigens gilt als wichtigstes und notwendiges Prädispositionsmerkmal für das Entwickeln einer Zöliakie) welches die intestinalen Immunzellen präsentieren. Potenziert wird das Eingehen dieser Verbindung durch ein ubiquitäres Enzym, der Gewebs-Transglutaminase (TG2), dem Zöliakie-Autoantigen (10). Die TG2 desaminiert bestimmte Glutamin-Gruppen an den immunogenen Peptiden zu Glutamat. Dadurch wird die Bindungsaffinität der Peptide an HLA-DQ2 bzw. HLA-DQ8 sowie die nachfolgende T-Zell-Aktivierung erhöht (10, 11). Infolgedessen kommt es zu einer Zottenatrophie sowie Kryptenhyperplasie im Dünndarm, den typischen histologischen Befunden bei Zöliakie. Ebenfalls zu beobachten ist die typische Malabsorption mit entsprechenden Effekten wie Nährstoffmangel sowie – möglicherweise Zöliakie-bedingten – autoimmunen Störungen (12, 13).

Obschon eine Vielzahl von Untergruppen des HLA-DQ2 bzw. HLA-DQ8 identifiziert und das Eingehen von Bindungen mit Gluten-Peptiden als Ursache von Zöliakie

festgestellt wurde (14-16), gibt es dennoch einen großen Prozentsatz an Personen (> 90%) der diese HLAs exprimiert jedoch nicht erkrankt.

Nur 2-5% der Träger von HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 entwickeln eine Zöliakie, was nahelegt, dass auch andere Ursachen bei der Krankheitsentstehung eine Rolle spielen, insbesondere die Rolle des angeborenen Immunsystems.

Das angeborene Immunsystem ist in vielerlei Hinsicht dafür verantwortlich frühzeitig und effizient auf chemische wie mikrobielle Stimuli zu reagieren sowie eine hochwichtige Funktion beim Priming des adaptiven Immunsystems einzunehmen. Zu den reaktiven Zellen des angeborenen Immunsystems zählen in erster Linie die Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen (DC) sowie polymorphkernige Granulozyten (PMN), auch als Neutrophile bezeichnet. Diese Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie gewisse Muster über ihre Rezeptoren, z.B. die Toll-like Rezeptoren (TLRs), erkennen und eine Freisetzung von Chemokinen oder proinflammatorischen Zytokinen induzieren, was wiederum zur Folge hat, dass weitere Immunzellen aktiviert werden (17).

Eben diese Stimulation des angeborenen Immunsystems wurde in einer Studie bei zwei Peptiden des α -Gliadins beobachtet, und zwar den Peptiden p31-43 sowie p31-49, die vom adaptiven Immunsystem nicht erkannt werden, aber in Patienten-Biopsien IL-15- sowie COX-2-Expression hervorriefen (18). Eine weitere Studie stellte fest, dass die gleichen Peptide auch MHC I Polypeptid Sequenz A (MICA)-Expression auf Darmepithelzellen verursachten, der verantwortliche Rezeptor ist bislang allerdings unbekannt (19).

Weitere Arbeiten zeigten, dass Gliadin in Monozyten und dendritischen Zellen eine verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle sowie proinflammatorischer Zytokine verursachte (20, 21). Zusätzlich wurde beobachtet, dass der Rezeptor CXCR3 nach Stimulation mit Gliadin, MyD88-abhängig mit einer gesteigerten intestinalen Permeabilität vergesellschaftet war, nichtsdestotrotz konnte kein dafür verantwortliches Peptid sicher festgestellt werden (22, 23).

Insgesamt kann man sagen, dass die genaue Funktion des angeborenen Immunsystems im Rahmen einer Zöliakie-Erkrankung nicht hinreichend geklärt ist. Aufgrund dieser teilweise unklaren Beweislage lohnt es die Bestandteile des Weizens noch eingehender zu betrachten; dort findet man neben den bereits genannten Albuminen und Globulinen auch andere Proteine, wie z.B. die α -Amylase-Trypsin Inhibitoren (ATIs). ATIs gehören zur Familie der Enzyme und hemmen die Aktivität der

Verdauungsenzyme Amylase und Trypsin, sie zählen zur pflanzeneigenen Fraßverteidigung und machen ca. 4% des Gesamtproteinanteils Gluten-haltigen Getreides aus (4, 24). Der Schutz vor Fressfeinden ist selbstverständlich auch von großem wirtschaftlichem Interesse und hat dazu geführt, dass der Anteil an ATIs im Getreide über Züchtung kontinuierlich zunimmt (24).

Schon einige Jahre stehen die ATIs daher im Interesse der Forschung und eine Studie hat bereits gezeigt, dass ATIs über den TLR4-Rezeptor Makrophagen, Monozyten sowie dendritische Zellen aktivieren und somit die intestinale Entzündung befeuern (25).

In meiner Arbeit befasse ich mich mit den Neutrophilen Granulozyten, die ebenfalls einen Teil des angeborenen Immunsystems darstellen und bisher noch nicht im Zusammenhang mit ATIs untersucht wurden. Da ein Einfluss auf andere Immunzellen bereits nachgewiesen wurde, stellt sich die Frage ob PMN ein ähnliches Bild zeigen oder gar völlig anders reagieren, wenn sie mit ATIs in Kontakt kommen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Neutrophile Granulozyten – Teile der angeborenen Immunantwort

Neutrophile Granulozyten, die aufgrund ihrer Kerneigenschaften auch als polymorphkernige Granulozyten bezeichnet werden, bilden die erste Linie der menschlichen Infektabwehr. Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems und zu einer direkten, sofortigen Immunreaktion im Stande. Um ein Verständnis für die verschiedenen granulozytären Fähigkeiten zu entwickeln, sollen in diesem Abschnitt vorerst grundlegend die physiologischen Vorgänge der PMN – welche in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen – aufgeführt werden.

2.1.1 Auswanderung und Aktivierung

PMNs machen etwa 60 Prozent aller Leukozyten des Blutes aus. Ihre Emigration aus dem Blutstrom ist Voraussetzung für den Prozess der Aktivierung. Im venösen System, welches dem Kapillarnetz nachgeschaltet ist, herrscht eine verminderte Blutströmungsgeschwindigkeit. Dies ermöglicht den Zellen, langsam an der Gefäßwand entlang zu rollen. Den Prozess dieser „Margination“ unterstützen E- und P-Selektine des Endothels der Venolenwand und daran bindende granulozytäre L-Selektine (26). Im weiteren Verlauf initiiert ein spezielles Adhäsionsmolekül (β 2-Integrin) den Prozess des slow rolling in Zusammenarbeit mit dem E-Selektin (26). Letztendlich erfolgt die Diapedese der Neutrophilen durch das Endothel hindurch zum Ort des entzündlichen Geschehens. Die Aktivierung erfolgt unter anderem durch Chemokine. Insbesondere Interleukin (IL)-8, ein neben Gewebszellen ebenso von Neutrophilen hergestellter Entzündungsmediator, wirkt stark - auch über positive Rückkopplungsmechanismen – auf PMNs. Die Bindung eines solchen extrazellulären Botenstoffes an seinen Rezeptor löst Signalkaskaden aus, die zur Konformationsänderung von Integrinen beitragen (26). Sie liegen nun in einem sensibleren, sogenanntem Hochaffinitätszustand vor. Dieser Zustand erlaubt es einen Liganden aus einer Bindungstasche zu entlassen und den Granulozyten-Stopp am Endothel zu fördern. Generell erfordert die vollendete Aktivierung der PMNs jedoch einen zweistufigen Prozess. Die bereits beschriebene Stimulation durch proinflammatorische Zytokine [IL-8, IL-1 β , Tumornekrosefaktor- α (TNF- α),

Leukotriene, bakterielle Peptide und viele mehr] stellt einen Voraktivierungsschritt dar, auf den ein späterer, zweiter Stimulus folgt oder sich zyklisch wiederholt (27, 28). Des Weiteren erfolgt eine Aktivierung der PMNs lokal im Infektionsgebiet.

Hier binden ihre unspezifischen Oberflächenrezeptoren die Opsonine, welche Pathogene markieren. Rezeptoren, die diese Arbeit leisten, sind unter anderem ein Fc γ -Rezeptor, Komplement-Rezeptor, scavenger-Rezeptor und Toll-like-Rezeptoren aber auch Lektine (27). Fc γ -Rezeptoren sind befähigt IgG-Antikörper, die einen Fremdpartikel opsonieren, an ihrem Fc-Fragment zu binden. Ein Kontakt zwischen dem Immunglobulin und dem Rezeptor regt im Folgenden die Polymerisation des Aktinzytoskeletts an, welche wiederum die Aufnahme des Partikels einleitet (26). Dank dreier Komplementrezeptoren (CR) sind PMNs in der Lage auch Pathogene zu erkennen, die durch Spaltprodukte des Komplementsystems markiert wurden. Beispielsweise bindet CR1 die Opsonine C1q, C4b, C3b sowie Mannan-bindendes Lektin. Chemokine, wie TNF- α oder bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) stimulieren die Phagozytoseaktivität von PMN über CR3 (26). Lipoproteine, Polyribonukleotide und LPS können über scavenger-Rezeptoren identifiziert werden. Eine Bindung löst die Internalisierung dieser Strukturen aus (26). Das Aufspüren infektiöser Mikroorganismen und die Unterscheidung von körpereigenen vs. körperfremden Kohlenhydraten ist neutrophilen Granulozyten über Lektine gestattet (26).

Kommt ein Kontakt zwischen den genannten Rezeptoren und dem adäquaten Liganden zustande, existiert eine Vielfalt von Transduktionswegen zur Fortleitung des Signals ins Zellinnere. Eine wichtige Rolle spielt die Phosphoinositol 3-Kinase, welche einen Phosphorylierungsschritt katalysiert, der im weiteren Kaskadenverlauf die Proteinkinase B als wichtigen Zellboten rekrutiert. Die Aktivierung der Phospholipase C trägt zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bei, welche wiederum einen entscheidenden Einfluss auf die vermehrte Aktivität des Enzyms Proteinkinase C ausübt. Auch das kleine G-Protein Rho nimmt am Prozess der intrazellulären Signalfortleitung teil. Aufgrund seiner Mitwirkung an vielen verschiedenen zellulären Signaltransduktionswegen hat es eine Schlüsselrolle bei der Informationsweitergabe auf Zellebene inne (26).

2.1.2 PMN–Effektorfunktionen

Angelockt durch einen Konzentrationsgradienten chemokiner Botenstoffe von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wandern PMNs aus der Blutbahn ins Entzündungsgebiet ein, werden aktiviert und gehen ihren Hauptfunktionen nach: Erkennung, Phagozytose und Eliminierung von Pathogenen (29).

Die Phagozytose ist eine der wichtigsten Fähigkeiten eines neutrophilen Granulozyten. Nach der rezeptorvermittelten Identifizierung eines Fremdartigens (befähigt sind die zuvor genannten Rezeptoren: Fc γ -, Komplement-, scavenger-, TLR-Rezeptoren und Lektine) folgt dessen endozytotische Aufnahme und Abkapselung im Zellinneren, im Phagosom.

Ein Enzym der Membran des Phagosoms ist die Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) plus Proton/Wasserstoffion (H⁺)-Oxidase. Abbildung 1 veranschaulicht die Aktivierung der NADPH+H⁺-Oxidase durch mehrere zytosolische Komponenten und dem Cytochrom b₅₅₈. Die aktive Oxidase katalysiert die Bildung von Superoxidanionen (O₂⁻).

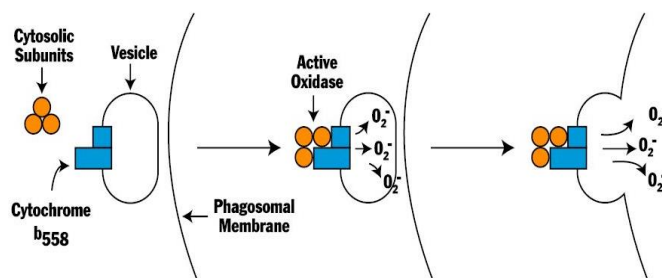


Abbildung 1: Aktivierung der NADPH-Oxidase in Zusammenwirken mit Cytochrom b₅₅₈ (30)

In ruhenden Neutrophilen befinden sich 10-15 Prozent des Flavocytochroms b₅₅₈ in der Plasmamembran, der verbleibende Rest in der Membran sekretorischer Vesikel sowie spezifischer Granula (31, 32).

Auf Stimulation durch Entzündungsmediatoren oder mikrobielle Antigene folgt zum einen die Fusion der b₅₅₈-reichen Granula mit der Plasmamembran des Leukozyten, und zum anderen die Phosphorylierung zytosolischer Bestandteile, Austausch des Guanosindiphosphats (GDP) und die Translokation an die Membran (s. Schema Abbildung 1). Sobald daraufhin die Oxidase vollständig zusammengesetzt ist, transferiert diese die zytosolisch lokalisierten Elektronen von NADPH+H⁺ über die Membran hinüber auf den Elektronenakzeptor molekularen Sauerstoff (32).

Die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies werden von einem zweiten Enzym, der Superoxiddismutase, zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) umgewandelt. Auch eine Reaktion

der Oxidationen mit dem entstehenden Wasserstoffperoxid zu Hydroxyradikalen ist möglich. Die Myeloperoxidase (MPO) ein Enzym, welches in den azurophilen Granula der Granulozyten vorkommt, oxidiert Chlorid zu Bakterien-toxischen Hypochlorit-Ionen. Zu diesen oxidativen Stoffwechselprozessen gehört ebenfalls die Inaktivierung bakterieller Enzyme durch Stickstoffmetaboliten der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (26, 32). Zu weiteren toxischen Substanzen zählen Defensine und Elastase. Die Gesamtheit dieser enzymatischen Vorgänge in den Fresszellen führt zu einer enormen Produktion bakterizider Metaboliten. Sie wird als oxidativer oder auch respiratorischer Burst bezeichnet und hat die Elimination des Pathogens zum Ziel (33). Die weitere enzymvermittelte Zerlegung des Mikroorganismus geschieht nach der Verschmelzung des Phagosoms mit einem Lysosom des Granulozyten. Das Ergebnis dieses Fusionsproduktes ist das Phagolysosom. Hier wirken sauerstoffunabhängige Zerstörungsmechanismen, beispielsweise die Degranulation zytoplasmatischer Granula der PMNs innerhalb des Phagolysosoms (32).

Die Freisetzung antimikrobieller Proteine aus den Neutrophilen erhöht die Effektivität der Pathogenabtötung (32). Reife PMNs besitzen nach histochemischer Färbung Peroxidase-positive und -negative Granula. Zu den Proteinen der Peroxidase-positiven, azurophilen Granula (primären Granula) gehören unter anderem Defensine, Elastase, Cathepsine und die MPO (32). Diese primären Granula, aber auch sekundäre, MPO-8 enthaltende Granula, fusionieren mit dem Phagolysosom. Die auf einen externen Fremdstimulus ausgelöste Degranulation hingegen verläuft anders, hier werden Inhalte aus sekretorischen und Gelatinase-reichen Granula mobilisiert (34). Neben Phagozytose, oxidativem Burst und Degranulation verfügen Granulozyten über einen weiteren Mechanismus zur Eliminierung von extrazellulären Fremdantigenen: Neutrophil extracellular traps (NETs).

Hierbei handelt es sich um Verbindungen aus Enzymen (unter anderem der neutrophile Elastase, Cathepsinen, MPO, Lactoferrin und Gelatinase) sowie Chromatin (DNA und Histone), die von aktivierten PMNs bereits zehn Minuten nach Aktivierung in den Extrazellularraum abgegeben werden und sowohl auf grampositive als auch gramnegative Erreger eine bakterizide Wirkung entfalten und ebenso mikrobielle Virulenzfaktoren abschwächen (35). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Bildung von NETs durch ein eukaryotisches Pathogen – *Candida albicans* – in Hyphen- sowie Hefeform induziert wird und das Pilzwachstum stark eindämmt (36). Trotz der bereits stattgefundenen direkten Visualisierung von NET-

Formationen infolge einer bakteriellen *in vivo* Infektion (37, 38), wird die Bildung von NETs und ihr Mitwirken an Abwehr und Tötung von Pathogenen noch ausführlich aus verschiedenen Blickwinkeln beleuchtet (29).

Dass es womöglich nicht nur extrazelluläre Pathogene sind, gegen welche neutrophile Granulozyten bereits beschriebene Schutzmechanismen ausgebildet haben, sondern sie auch in der aktiven Abwehr von intrazellulären Erregern, wie Viren und Mykobakterien, eine Rolle spielen, gerät zusehends in den Fokus der Forschung. Viele Studien deuten auf einen umfassenderen Beitrag der PMNs an infektiösen Erkrankungen hin als bislang angenommen (29, 39-41).

Hinzu kommt, dass Granulozyten als Zellen der angeborenen Immunität und ihre Rolle in der Elimination von Pathogenen lange unterschätzt wurden.

Ihr funktionelles Spektrum, so zeigen aktuelle Arbeiten, ist insofern weit komplexer, als dass sie an einer Vielzahl von Interaktionen mit unterschiedlichen Immunzellen (beispielsweise dendritischen Zellen, Lymphozyten und natürlichen Killerzellen) auf unterschiedlichen Ebenen beteiligt sind. Beispielsweise wandern sie, nach mikrobieller Stimulation, in die Marginalzone der Milz ein, wo sie die Ausreifung und Antikörperproduktion der Marginalzonen-B-Zellen unterstützen. Außerdem aktivieren sie im Zusammenspiel mit dendritischen Zellen die natürlichen Killerzellen (29). Somit üben PMNs als Bestandteil des angeborenen Immunsystems Einfluss auf die erworbene Immunreaktion aus (29).

2.1.3 Toll-like Rezeptoren – Schnelle Immunantwort dank Mustererkennung

Toll-like Rezeptoren (TLRs) befinden sich in den Zellmembranen vieler Zellen, wie z.B. Endothelzellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und einer Reihe anderer Zellen des Immunsystems, auch den neutrophilen Granulozyten. Die erste TLR-Familie wurde in der Taufliege (*Drosophila*) entdeckt, wo TLRs unter anderem an der Embryogenese beteiligt sind; interessanterweise gibt es aber auch bei *Drosophila* ein Mitglied der TLR-Familie, die der Pathogenerkennung dient. Die Aufgabe der Pathogenerkennung ist im Falle des Menschen die überwiegende Funktion von TLRs

(33). Dieser Rezeptor-Typ zeichnet sich dadurch aus, dass er durch bestimmte Moleküle aktiviert wird, man spricht hier meistens von einer Erkennung pathogen-assoziiertes Merkmale, z.B. die Erkennung des LPS gramnegativer Bakterien durch TLR4. Im Genom des

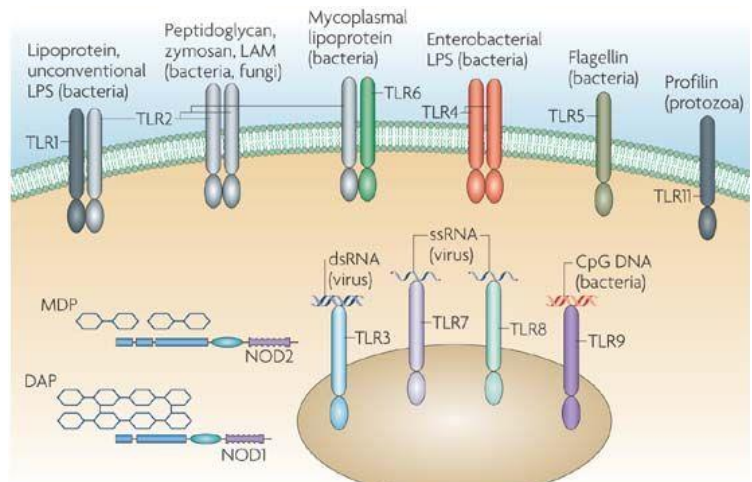


Abbildung 2: Humane TLRs und ihre Liganden (33)

bereits zehn TLRs identifiziert worden (33). Abbildung 2 zeigt eine Übersicht der TLR im menschlichen Organismus und ihre Liganden (33). Mithilfe dieser Rezeptoren haben die genannten Leukozyten die Möglichkeit eine mikrobielle Gefahr schnell zu erkennen und ein potenzielles Eindringen in die menschlichen Körperzellen zu verhindern. Die Antigenbindung an der extrazellulären Leucin-reichen Wiederholungsdomäne (42) löst eine mehrschrittige, intrazelluläre Signalkaskade aus, die zuletzt auf Ebene der Transkription und Translation die Herstellung und Freisetzung verschiedener entzündlicher Mediatoren zur Eindämmung der Infektion regelt (26). An die zytoplasmatische Toll/Interleukin-1 (IL-1)-Rezeptor (TIR)-Domäne diffundiert das „myeloid differentiation primary-response protein 88“ (MyD88) heran, welches sodann in Kontakt mit IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) tritt. IRAK4 verbindet sich daraufhin mit IRAK1, und phosphoryliert das MyD88 in einem weiteren Schritt. Im Folgenden wird tumornecrosis-factor-receptor-associated factor 6 (TRAF6) zu dem Kinasenkomplex rekrutiert. Hieran anschließend findet eine Ablösung von IRAK1 und TRAF6 am Rezeptor statt und es formt sich eine neue Verknüpfung mit anderen Proteinen. Diese Neu-Vereinigung fügt schließlich einen Phosphatrest sowohl an die mitogen-activated protein (MAP) Kinase, als auch an den inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-Kinasekomplex an. Diese intrazelluläre Signalverkettung endet mit der Translokation des aktivierten Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern, wo die Expression inflammatorischer Zytokin-Gene induziert wird (33, 42).

2.2 Glutenunverträglichkeit – zwischen Trend und Krankheit

2.2.1 Definition der Zöliakie

Bei der Zöliakie handelt es sich um eine Unverträglichkeit gegen die Gliadinfraktion in Gluten-haltigem Getreide. Die Zöliakie – auch als glutensensitive Enteropathie bezeichnet – ist eine häufige, HLA-assoziierte Erkrankung und geht oft mit weiteren Autoimmunerkrankungen einher. Pathophysiologisch geht man von einem Zusammenwirken einer Glutenunverträglichkeit sowie einer autoimmunen Komponente mit Ausbildung von Autoantikörpern gegen die Gewebstransglutaminase aus. Klinisch zeigt diese Erkrankung ein mannigfaltiges Bild, welches von Durchfällen bis hin zu depressiven Verstimmungen reicht. Die Diagnose einer Zöliakie kann über die Bestimmung spezieller Antikörper im Blut sowie über eine Dünndarm-Biopsie gestellt werden. Der zweifelsfreie Nachweis ist insbesondere im Hinblick auf die Lebensqualität des Patienten sehr wichtig, da bis heute die wirksamste Methode eine lebenslang glutenfreie Diät ist. Mit der Einhaltung dieser speziellen Diät ist die Lebenserwartung normal (43).

2.2.1.1 Epidemiologie

In Deutschland beträgt die Prävalenz der Zöliakie ca. 0,3%. Allerdings rückt das Krankheitsbild Zöliakie mehr und mehr in den Fokus der Ärzteschaft, da die klinische Manifestation sehr unterschiedlich sein kann und daher auch oft die Verdachtsdiagnose Zöliakie gestellt wird. Insgesamt sind Frauen häufiger als Männer betroffen. Im Rahmen der Erstmanifestation gibt es drei Erkrankungs-Peaks in Abhängigkeit vom Alter des Patienten; nach dem Abstillen, im Schulalter und in der vierten Lebensdekade (43).

2.2.1.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Eine genetische Disposition mit Assoziation zu HLA-Antigenen ist sehr häufig, bei über 90% ist das HLA-DQ2, alternativ das HLA-DQ8 feststellbar (43). Wie in der Einleitung jedoch bereits erwähnt, kommen die beschriebenen HLAs auch auf den Immunzellen symptomfreier Personen vor, das Vorliegen der HLA-Typen kann also nicht allein ursächlich sein. Des Weiteren besteht ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung einer

Zöliakie bei Vorhandensein gewisser Risikofaktoren – insbesondere bei Typ 1 Diabetes – aber auch bei gewissen Gendefekten (Trisomie 21, Turner-Syndrom) und anderen Autoimmunerkrankungen (43). Ein betroffener Eltern- oder Geschwisterteil erhöht die Häufigkeit der Entwicklung einer Zöliakie, sind zwei oder mehr Familienmitglieder ersten Grades betroffen, wiegt das Risiko umso schwerer (44). Pathophysiologisch erklärt man sich das Krankheitsbild als eine Mischung aus Elementen einer Allergie (gegen Gliadin/Gluten) mit autoimmuner Komponente (Autoantikörper nachweisbar). Beim Verzehr Gluten-haltiger Nahrung kommt es zu Spaltprodukten durch die Gewebstransglutaminase, die zu einer Immunreaktion führen; die Gewebstransglutaminase fungiert in diesem Beispiel als Autoantigen, dadurch kommt es zur Bildung von Antikörpern gegen das Endomysium und die Transglutaminase. Dies führt zu einer Zottenatrophie mit Kryptenhyperplasie (histologisch feststellbar) und hat über längere Zeit ein Malabsorptionssyndrom zur Folge (43).

2.2.1.3 Marsh–Klassifikation

Die histologische Untersuchung teilt den Zöliakie-Befund nach Marsh ein, hier werden in erster Linie verschiedene Schweregrade von Zottenatrophie benannt.

Abbildung 4 zeigt schematisch einen Normalbefund auf der linken Seite (Typ 0) wohingegen bei Typ 4 auf der rechten Seite die Zotten bereits vollkommen atrophiert sind. Die schwarzen Punkte auf der Zeichnung zeigen leukozytäre Infiltrate, die proportional zum Grad der Zottenschädigung zunehmen. Die weißen Hohlräume auf der Zeichnung zeigen Lieberkühn'sche Krypten.

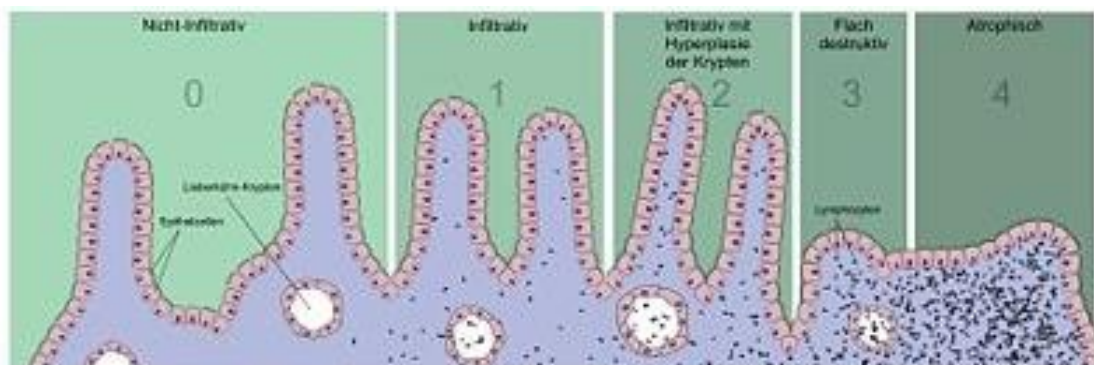


Abbildung 3: Histologischer Befund einer Dünndarmbiopsie, Marsh 0-4 (2)

2.2.1.4 Klinisches Bild

Im Rahmen der Definition wurde bereits darauf verwiesen, dass die klinische Symptomatik sehr variabel ist und von depressiven Verstimmungen bis hin zu Diarrhöen reichen kann. Bei der Feststellung im frühen Kindesalter beobachtet man oft ein Abfallen oder Stagnieren der Wachstums- und Gewichtskurve, eine sogenannte Gedeihstörung. Insgesamt sind betroffene Kinder meist sehr zierlich, haben eine schlecht ausgebildete Muskulatur, zeigen Anämiezeichen und fallen in der Schule durch häufige Abwesenheit wegen Krankheit auf. Weitere diagnostische Hinweise liefert ein dermatologischer Befund, die Dermatitis herpetiformis Duhring (Abbildung 4), eine häufige Hautmanifestation bei klassischer Zöliakie. Neben der klassischen Manifestation gibt es einen subklinischen Verlauf, bei dem keine Symptome bestehen,



Abbildung 4: Dermatitis herpetiformis Duhring (1)

jedoch die Dünndarmbiopsie und auch die Blutuntersuchung Zöliakie-positiv ausfallen. Das Schlusslicht bildet die Form der potentiellen Zöliakie, sie geht ohne spezifische Symptome und mit negativer Dünndarmbiopsie einher; zeigt aber einen positiven Antikörperbefund (43). Diese breit gefächerten Möglichkeiten zur Manifestation, handelten der Zöliakie das Pseudonym „Chamäleon der Gastroenterologie“ ein.

2.2.1.5 Therapie und Prognose

Die Therapie einer Zöliakie besteht in einer lebenslangen, Gluten-freien Diät. Hierzu zählt auch die Vermeidung Gluten-haltiger Zusatzstoffe in Fertigprodukten. Des Weiteren kann eine Zöliakie einen sekundären Laktasemangel nach sich ziehen, dann sollten auch Milchprodukte vermieden werden (43). Histologisch zeigt sich innerhalb weniger Wochen bis Monate eine Besserung mit sich regenerierendem Zottenepithel. Bedingt durch die Malabsorption, insbesondere der fettlöslichen Vitamine bis zum

Zeitpunkt der Diagnosestellung, empfiehlt sich eine bedarfsgerechte Eisen- und Vitaminsubstitution.

Bei Einhaltung der speziellen Diät ist die Prognose sehr gut (43). Zu den bekannten Komplikationen zählen neben dem sekundären Laktasemangel, gastrointestinale Beschwerden trotz Einhaltung der Diät insbesondere das Enteropathie-assoziierte T-Zell-Lymphom, eine sehr seltene Tumorerkrankung mit einem mittleren Erkrankungsalter um die 60 Jahre. Das genannte T-Zell-Lymphom tritt nicht ausschließlich bei Zöliakie-Patienten auf, ist aber in 80% der Fälle mit einer Zöliakie assoziiert. Ein großes Problem der Patienten im Falle einer Erkrankung ist die ebenfalls sehr unspezifische Allgemeinsymptomatik – wie Übelkeit/Erbrechen – die eine Früherkennung erschwert (43).

2.2.2 NCGS – Trend oder reales Problem?

Die Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität (syn.: Weizensensitivität, englisch non-celiac-gluten-sensitivity, Abk.: NCGS) beschreibt ein Beschwerdebild, das der Zöliakie ähnelt und als Differentialdiagnose in Betracht kommt (43). Bei der NCGS fehlen die Zöliakie-typischen klinischen Beweise, wie z.B. ein Antikörpernachweis. Patienten berufen sich meistens auf unspezifische, Reizdarm-ähnliche Symptome nach dem Genuss Gluten-haltiger Speisen, aber auch depressive Verstimmungen und Gliederschmerzen werden angegeben (43). Durch fehlende Nachweis-Möglichkeiten handelt es sich im Falle der NCGS oft um eine Selbstdiagnose, auch genießt Gluten einen schlechten Ruf und Patienten erleben einen Nocebo-Effekt nach Genuss Gluten-haltiger Speisen (45). Da beim NCGS laborchemisch und histologisch keine Ähnlichkeiten zur Zöliakie bestehen, nimmt man andere Ursachen der Beschwerden an. Als verdächtig gelten die Amylase-Trypsin Inhibitoren (ATIs) sowie die Gruppe der „fermentierbaren Oligo-, Di- und Monosacchariden sowie Polyole (FODMAPs)“, die nicht nur in Gluten-haltigem Getreide, sondern auch in Milchprodukten und einigen Gemüsesorten zu finden sind (45).

Nach der Verdachtsdiagnose eines NCGS soll leitliniengerecht für einige Wochen auf Gluten komplett verzichtet werden, im Anschluss erfolgt dann eine doppelblinde Provokation mit Weizen. Verbessern sich die Symptome während des Gluten-freien

Intervalls und verschlechtern sich nach Provokation mit Weizen signifikant, gilt eine NCGS als wahrscheinlich (45).

Eine Studie aus dem Jahr 2011 hat sich genau mit eben dieser Fragestellung beschäftigt. Untersucht wurde der Effekt einer Gluten-freien Ernährung auf die Punkte „Gesamtsymptomatik“, „Schmerzen“, „Völlegefühl“, „Zufriedenheit mit der Stuhlkonsistenz“, „Übelkeit“, „Blähungen“ und „Müdigkeit“. Patienten beurteilten sich selbst anhand einer Visuellen Analog Skala (VAS) von 0 bis 100 (46). Das ausgesuchte Patientenkollektiv litt unter unklarer Reizdarm-Symptomatik, hatte unter Gluten-freier Diät bereits subjektive Erleichterung verspürt und bei allen wurde eine Zöliakie mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen (46). Aus anfänglich 103 Patienten wurden letztendlich nur 34 rekrutiert und mit Hilfe eines Computersystems randomisiert. Nach Randomisierung kamen 19 Patienten in die Interventions- und 15 Patienten in die Placebogruppe. Für zwei Wochen starteten beide Gruppen eine Gluten-freie Ernährung, ab Woche 3 wurden die Patienten zum täglich zusätzlichem Konsum eines Studien-Muffins sowie zwei Scheiben Studien-Brot angehalten, die Gluten-freie Diät musste parallel weiter durchgeführt werden (46). Die Backmischungen waren für beide Gruppen primär Gluten-frei, für die Patienten in der Interventionsgruppe wurden die Backwaren nachträglich durch industriell hergestelltes, sehr reines Gluten ergänzt. Insgesamt kamen die Patienten in der Interventionsgruppe auf eine tägliche Glutenmenge von 16g. Die Protein-Fractionen im Gluten bestanden zu 47,5% aus Glutenin, zu 52% aus Gliadin und zu 2,3% aus anderen Proteinen (46).

Im Laufe der sechs Wochen dauernden Intervention bewerteten die Patienten wöchentlich ihr Befinden in Bezug auf die sieben genannten Punkte und beide Gruppen gaben eine kontinuierliche Zunahme ihrer Beschwerden in allen genannten Punkten an (46). Interessanterweise war der Eindruck vermehrter Beschwerden in der Interventionsgruppe jedoch tendenziell und teilweise auch signifikant höher (46).

Abbildung 6 zeigt die Entwicklung der Beschwerdesymptomatik in beiden Gruppen. Laut Studie signifikant waren der Einfluss auf abdominale Schmerzen ($p=0,02$), Müdigkeit ($p=0,001$) und Zufriedenheit mit der Stuhlkonsistenz ($p=0,03$). Nicht signifikant waren die Unterschiede im Hinblick auf Übelkeit, Blähungen und Gesamtsymptomatik ($p>0,05$). Zusätzlich erhielten alle Patienten vor Beginn der

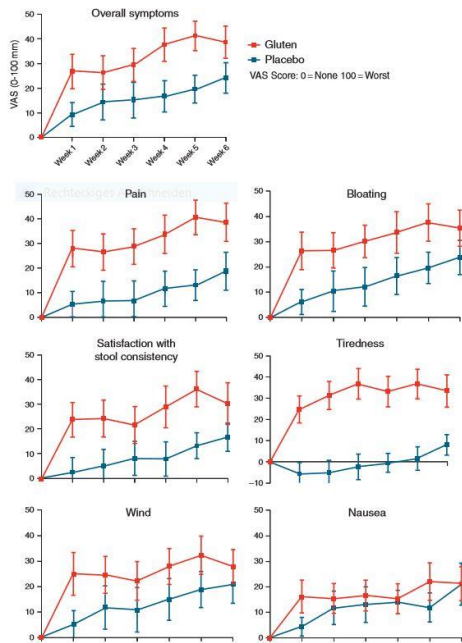


Abbildung 5: Entwicklung der Beschwerdesymptomatik beider Gruppen (unter Gluten-Exposition oder Placebo) (52)

Intervention eine Bestimmung von Biomarkern, die typischerweise bei Zöliakie eine Rolle spielen. Neben der Gewebs-Transglutaminase und dem C-reaktivem Protein wurde auch die intestinale Permeabilität mit Hilfe des L:R Verhältnis (Lactulose:Rhamnose) bestimmt. Hierbei ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (46). Dadurch, dass drei der untersuchten Beschwerdeformen jedoch statistisch signifikant waren, kam die Studiengruppe zu dem Schluss, dass eine NCGS existieren könnte und „weitere Untersuchungen gerechtfertigt seien“ (46).

Die kleine Stichprobe von lediglich 34 Patienten liefert Grund zur Annahme, dass statistische Fehler sich überdurchschnittlich hoch auf das Gesamtergebnis auswirken.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Patienten aus der Interventionsgruppe trotz aller Bemühungen die Modifikation der Backwaren bemerkt haben. Vor Beginn der Intervention bestätigten zwar 10 unabhängige Personen, dass sie keinerlei Unterschied schmecken konnten, zu einhundert Prozent sicher ist dies jedoch nicht (46).

Zur Erlangung eines besseren Bildes der Problematik, beschäftigte sich eine weitere Forschungsgruppe im folgenden Jahr mit einer größer angelegten Studie. Insgesamt wurden 920 Patienten rekrutiert, die u.a. die Kriterien einer Reizdarm-ähnlichen Störung nach Rome II erfüllten. Um in die Studie aufgenommen zu werden, mussten die Patienten neben der Reizdarm-ähnlichen Störung u.a. negative Labor- und Histologienachweise für Zöliakie aufweisen und eine Auflösung der Symptome unter Gluten-freier Diät beobachten, welche nach doppelblinder Weizen-Provokation wieder

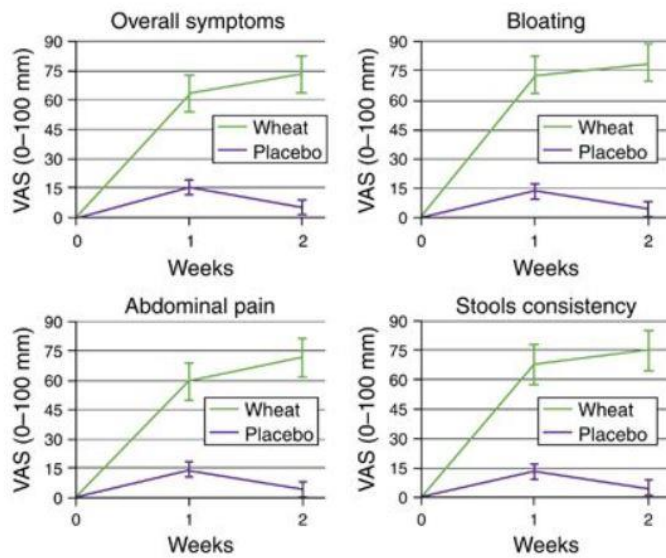
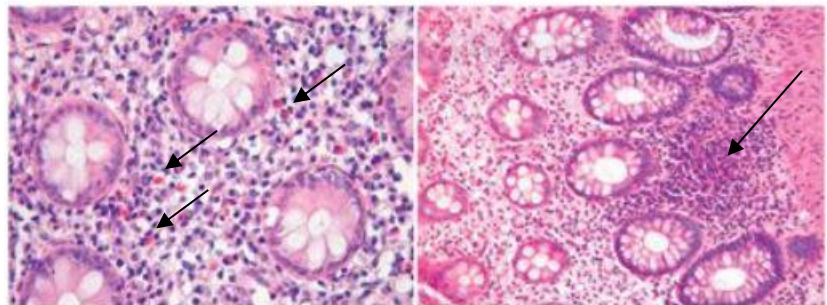


Abbildung 6: Darstellung der Symptomatik einer Weizen-Expositions- und Placebo-Gruppe anhand einer Visuellen Analogskala (54)

auftraten (47). Hierzu mussten alle Teilnehmer – nach einer Anlaufphase mit nicht mehr als 30g Weizen pro Tag für 2-4 Wochen – im Anschluss vier Wochen lang eine Gluten-freie Diät befolgen. Des Weiteren musste auch auf andere typische Nahrungsallergene wie Casein und Hühnereiweiß verzichtet werden. Nach diesen vier Wochen erfolgte die doppelblinde Provokation

mit entweder Weizenmehl oder Xylose in Kapselform. Insgesamt traten bei nur 276 Patienten die Symptome wieder auf und diese wurden in die Studie aufgenommen (47). Zur genaueren Abgrenzung der Beschwerdeursachen wurden die 276 Patienten erneut für vier Wochen auf die Auslassdiät gesetzt, hierauf folgte eine erneute Provokation, dieses Mal jedoch mit Casein (47). Hieraufhin wurde bei lediglich 70 von 276 Patienten (~25%) ein Nichtwiederauftreten der Beschwerden beobachtet, die anderen 206 Patienten klagten erneut über Beschwerden (47). In Folge dessen wurden die Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt, Gruppe 1 wurde als ausschließlich Weizen-sensitiv diagnostiziert, Gruppe 2 erhielt die Diagnose einer multiplen (Weizen- und Casein-sensitiv) Nahrungsmittel-Unverträglichkeit (47). Abbildung 7 zeigt die durch Patienten erhobene VAS, null bis zwei Wochen unter Weizen- bzw. Placebogabe. In der Grafik sind alle 276 Patienten repräsentiert, nicht allein die rein Weizen-sensitiven. Die erhobenen Daten sind alle statistisch signifikant mit $p < 0,05$. Keiner der Weizen-sensitiven Patienten zeigte zu irgendeinem Zeitpunkt weder vor noch nach der Intervention Anzeichen von Inflammation in Form einer Leukozytose, CRP-Anstieg oder erhöhter Blutsenkungsgeschwindigkeit (47). Allerdings zeigten die Weizen-sensitiven Patienten eosinophile Infiltrate im Duodenum und sogar noch mehr im Colon, ebenfalls konnten lymphozytäre Infiltrate im Duodenum und Colon beobachtet werden (47). Des Weiteren zeigten DQ2- bzw. DQ8-positive Patienten einen höheren Anteil an CD3 im Intestinaltrakt (47). Die HLAs-DQ2 und -DQ8 gelten

als wichtigstes Prädispositionsmerkmal für das Entwickeln einer Zöliakie (10). Abbildung 8 zeigt anhand von zwei Bildern die eosinophilen (links) sowie die lymphozytären (rechts) Infiltrate im Colon (47). Abschließend kann gesagt werden, dass die Ursachen für eine Reizdarm-ähnliche Symptomatik sehr verschiedener Genese sind und vor allem die emotionale Komponente eine tragende Rolle spielen dürfte. Nichtsdestotrotz verspürte ein gutes Viertel der Patienten nach der doppelblinden Ingestion von Weizen reale Symptome, demnach kam auch hier die Forschungsgruppe zu dem Schluss, dass eine NCGS als klinisch klar bestätigt werden könne (47). In vorigen Abschnitten wurde bereits auf das sehr breite Spektrum an Symptomen einer Zöliakie eingegangen, u.a. fanden dort depressive Verstimmungen Erwähnung. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2014 beschäftigte sich näher mit diesen sehr typischen Stimmungsschwankungen, die bei einer Zöliakie auftreten können und formulierte die Hypothese, dass ein solcher Effekt auch bei NCGS-Patienten vorliegen könnte (48). Die Patientengruppe war hier mit nur 22 Teilnehmern ebenfalls vergleichsweise klein. Zur Bestimmung einer „baseline“ wurden die Patienten mit Hilfe eines Screenings auf depressive Symptomatik vor Beginn der Studie erfasst; dem Spielberger State Trait Personality Inventory (STPI). Der STPI erlaubt – im weitesten Sinne – die Erfassung von



Charaktereigenschaften,

Abbildung 7: eosinophile und lymphozytäre Colon-Infiltrate (53)

u.a. „Ängstlichkeit“ (49). Die Studienteilnehmer folgten zu Beginn der Studie alle ihrer Gluten-freien Diät, diese befolgten sie schon länger zwecks Symptomkontrolle ihrer NCGS (48). Die Patienten durchliefen abwechselnd über drei Tage eine Provokation mit täglich zusätzlich 16g Gluten, 16g Molke oder Placebo. Zwischen den unterschiedlichen Zyklen wurde immer für drei Tage auf die Nahrungszusätze verzichtet, um einen „wash-out“-Effekt zu erzielen (48). Nach drei Tagen Pause begannen die Patienten mit dem nächsten Zyklus. Innerhalb jedes Zyklus wurde regelmäßig der STPI erhoben. Zu zunehmenden gastrointestinalen Beschwerden kam es laut Angaben der Patienten nicht, signifikant war aber die Zunahme der depressiven Verstimmung unter Gluten-Verzehr veranschaulicht in Tabelle 1 (48).

Tabelle 1: Gegenüberstellung des STPI – dem aktuellen Zustand (state) und der interindividuellen Neigung zum Verhalten (trait) für Placebo, Molkeprotein (Whey) und Gluten. Gluten wurde mit einem signifikant höheren Zustand für die Depression assoziiert. Für die anderen Symptome konnte kein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden. Die Daten zeigen den Mittelwert, die Standardabweichung (s.d.), den p-Wert und die Effekt-Größe (η_p^2) (54).

STPI		Mean (s.d.)			P-value	η_p^2
		Placebo	Whey	Gluten		
State indices	Depression	19.20 (3.82)	19.75 (4.98)	21.45 (4.86)	0.011	0.38
	anxiety	17.55 (4.36)	17.05 (3.97)	18.05 (5.09)	0.65	0.05
	Curiosity	22.65 (7.86)	23.35 (6.48)	21.40 (6.31)	0.25	0.06
	Anger	10.80 (1.28)	10.70 (1.53)	11.25 (2.02)	0.56	0.04
Trait indices	Depression	18.45 (4.65)	19.85 (5.40)	18.80 (6.18)	0.54	0.02
	Anxiety	18.30 (4.24)	18.80 (3.44)	18.45 (3.95)	0.21	0.04
	Curiosity	27.95 (6.71)	27.05 (7.22)	27.75 (7.45)	0.70	0.01
	Anger	15.90 (5.43)	14.80 (4.19)	15.35 (4.77)	0.11	0.06

Die Studie kam zu dem Schluss, dass bereits kurzzeitige Exposition gegenüber Gluten einen signifikanten Effekt auf die Entwicklung depressiver Symptomatik hat, als Interpretation der Ergebnisse wurde angeführt, dass die Studie aufzeigt, wieso manche Patienten, die einer Gluten-freien Diät folgen, zwar keine Verbesserung der gastrointestinalen Symptome verspüren, trotz allem angeben sich subjektiv „besser zu fühlen“ und daher der Gluten-freien Diät weiter folgen (48).

Die Auswahl der Studien zeigt – wie bereits bei der Zöliakie – ein breites Spektrum an Einflussfaktoren auf die einzelnen Studienteilnehmer. Allen Patienten wurde Gluten in Form von Backwaren oder Kapselform in einem doppelblinden Verfahren verabreicht und alle Studien kommen zu dem Schluss, dass Gluten in irgendeiner Form Einfluss auf den Organismus nimmt. Eine Zöliakie wurde bei allen Studienteilnehmern im Vorfeld nach bestem Wissen und Gewissen ausgeschlossen, dies legt nahe, dass andere Strukturen im Gluten, nicht ausschließlich Gliadin und Glutenin, ebenso für Symptome zuständig sein könnten für die uns bisher klinische Nachweismöglichkeiten fehlen. Eine weitere Gruppe von Proteinen im Gluten hat bereits in einigen

Untersuchungen gezeigt, dass sie ebenfalls Einfluss auf biologische Vorgänge nimmt, die Amylase-Trypsin-Inhibitoren (13).

2.3 α -Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs)

ATIs sind wasserlösliche Proteine und gehören zur Gruppe der Albumine und Globuline. Sie sind eine Gruppe von Proteinen mit einem eher geringen Molekulargewicht von 12.000 bis 16.000Da (50) und inhibieren die Funktion von Amylasen und/oder Proteasen unterschiedlicher Herkunft. Die erste Beobachtung von ATIs im Weizen wurde 1973 von Silano *et al.* publiziert (51). Die Begriffe α -Amylase-Inhibitor (AI) und Trypsin-Inhibitor (TI) sind nicht klar definiert und werden in der Literatur oft im selben Kontext verwendet (3, 52, 53). ATIs hemmen die α -Amylase und/oder das Trypsin von Insekten, Spinnentieren und Säugetieren (53-55). Das reaktive Zentrum dieser bifunktionellen Inhibitoren wurde hierbei von Cuccioloni *et al.* identifiziert (54).

Es gibt drei Gruppen von ATIs: die ersten beiden zeigen hauptsächlich inhibitorische Aktivität gegen α -Amylase und die dritte Gruppe vereint die bifunktionelle Inhibition von α -Amylase und Trypsin (3, 56). Die erste Gruppe bildet der monomere Weizen-Amylase Inhibitor (WMAI), dieser enthält das monomere ATI 0.28, das auf dem kurzen Arm des Gruppe 6 Chromosoms auf dem B- und D-Genom des Weizens liegt (6B+6D) (3). Die zweite Gruppe wird als dimerer Weizen-Amylase Inhibitor bezeichnet (WDAI) und enthält die homodimeren ATIs 0.19 und 0.53. Diese Proteine wiederum liegen auf dem kurzen Arm des Gruppe 3 Chromosoms, auch hier auf dem B und D Genom (3B+3D) (3, 57). Die dritte und letzte Gruppe bilden die tetrameren Weizen-Amylase Inhibitoren (WTAI) und setzen sich zusammen aus den heterotetrameren ATIs CM1, CM2, CM3, CM16 und CM17. Die Nummerierung der verschiedenen ATIs beschreibt ihre Löslichkeit in einer Mischung (7:1, v/v) aus Chloroform und Methanol (56). Im Gegensatz zu den beobachteten Phänomenen bei den drei genannten Gruppen hemmen ATIs nicht die pflanzeigenen Enzyme (50).

Zwei weitere Protease-inhibierende Proteine aus der ATI-Familie sind der Weizen-Chymotrypsin- (WCI) und der Weizen-Amylase Subtilisin Inhibitor (WASI). Ein letzter Inhibitor aus dem Weizen wird als Bowman-Birk-Typ-Inhibitor bezeichnet mit inhibitorischer Aktivität gegen Trypsin, aber nicht gegen Amylase (58). Insgesamt sind 13 verschiedene ATIs im Weizen enthalten, die nachweislich als Protein und nicht nur

als Gensequenz vorliegen (Tabelle 5). Ihre Aminosäuresequenzen sind in der UniProtKB Datenbank einsehbar (59).

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen α -Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs) im Weizen. Die Abkürzungen dienen als Kurzform aufgrund der langen UniProtKB Namen. Die UniProtKB Verzeichnisnummer ist einzigartig für jeden ATI-Typ und wird als verlässliche Identifikation in der Datenbank genutzt. Außer CM17 haben alle ATIs eine Relevanz als eigenständiges Weizenprotein. Die Anzahl der Aminosäuren und das Molekulargewicht beschreiben die Proteine ohne ihr reaktives Zentrum. Alle Zystein-Reste befinden sich in der Aminosäuren-Kette und nicht im reaktiven Zentrum (59).

Abkürzung	UniProtKB Name	UniProtKB Nummer	Aminosäuren	Molekulargewicht [Da]	Cystein-Reste
ATI 0.28	Alpha-Amylase-Inhibitor 0.28	P01083	123	13,326	
ATI 0.19	Alpha-Amylase-Inhibitor 0.19	P01085	124	13,337	
ATI 0.53	Alpha-Amylase-Inhibitor 0.53	P01084	124	13,185	
CM1	Alpha-Amylase-Trypsin-Inhibitor CM1	P16850	120	13,086	10
CM2	Alpha-Amylase-Trypsin-Inhibitor CM2	P16851	120	13,035	10
CM3	Alpha-Amylase-Trypsin-Inhibitor CM3	P17314	143	15,832	9
CM16	Alpha-Amylase-Trypsin-Inhibitor CM16	P16159	119	13,437	10
CM17	Alpha-Amylase-Trypsin-Inhibitor CM17	Q41540	119	13,431	10
CMX1/3	Trypsin-Alpha-Amylase-Inhibitor CMX1/CMX3	Q43723	97	11,408	10
CMX2	Trypsin-Alpha-Amylase-Inhibitor CMX2	Q43691	97	11,466	10
WCI	Chymotrypsin-Inhibitor WCI	P83207	119	12,944	10

WASI	Endogener Alpha-Amylase-Subtilisin inhibitor	P16347	180	19,633	4
WTI	Bowman-Birk type-Trypsin-Inhibitor	P81713	71	7,962	10

ATIs im Vergleich zueinander besitzen zehn Zystein-Reste, welche fünf intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden; mit Ausnahme von WASI (vier Zystein-Reste) und 0.53 (neun Zystein-Reste) (60-62). Dies führt zu einer kompakten, dreidimensionalen Struktur, welche womöglich zu der hohen Hitzebeständigkeit und auch der starken inhibitorischen Aktivität auf die Verdauungsenzyme von Insekten und Säugern Einfluss nimmt (3, 56, 63). Anders als die Zusammensetzung des Glutens, welches vor allem reich an Glutamin und Prolin ist, haben ATIs ein eher ausgeglichenes Aminosäure-Profil. Daher ist zu vermuten, dass ATIs nicht nur wichtige Abwehrfunktionen gegenüber Fraßfeinden einnehmen, sondern auch als Speicherproteine der Pflanzen fungieren. Letztendlich kompensieren ATIs so einen Teil der fehlenden Aminosäuren des Glutens und dienen als wichtige Energiespeicher für das Wachstum des Keimlings (3, 64). Allgemein gilt, dass die Aminosäuresequenz der 13 verschiedenen ATIs eine sehr hohe homologe Übereinstimmung aufweisen (Abbildung 9). Die ATIs WASI und WTI sind den anderen ATIs sehr unähnlich (nur 0,4% Übereinstimmung) und unterscheiden sich auch stark voneinander (nur 8,4% Übereinstimmung). Die ATIs 0.19 und 0.53 (94,4% Übereinstimmung) CMX1/3 und CMX2 (99,2%, nur eine Aminosäure ausgetauscht), CM1 und CM2 (90,3%) und CM16 und CM17 (87,4%) verfügen über große Bereiche homologer Sequenzen. Die ATIs 0.19, 0.28 und 0.53 teilen sich fast die Hälfte ihrer Aminosäuresequenzen (43,6%) und die CM-Untergruppen CM1, CM2, CM3, CM16 und CM17 immerhin noch ein gutes

Viertel (27,6%). Der ATI der Gruppe WCI teilt sich mit den CM-Untergruppen nur wenige 16,5% (72).

Aufgrund der großen Homologie der verschiedenen ATIs zueinander, ist es eine wahre Herausforderung analytische Methoden zu entwickeln, um sie sauber voneinander unterscheiden zu können. Hinzu kommt das sehr ähnliche Molekulargewicht und die Polarität, was ebenfalls eine klare Trennung der ATIs erschwert. Für die Analyse der individuellen inhibitorischen Aktivität der ATIs, benötigt man stark aufgereinigte und

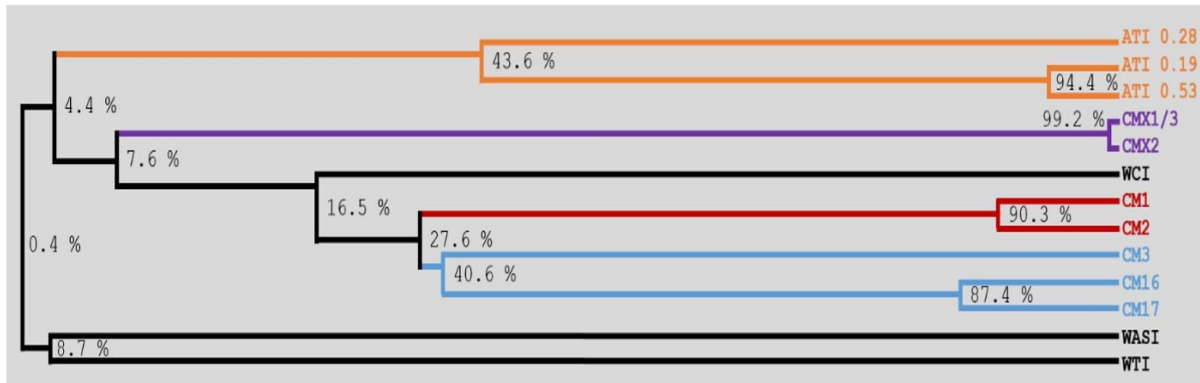


Abbildung 8: Übersicht über die Anordnung 13 verschiedener ATIs im Baumdiagramm mit Hilfe von Clustal Omega. Gleiche Farben zeigen einen hohen Grad an Homologie, die Zahlen verdeutlichen hierbei den genauen Anteil der homologen Sequenzen. Die Homologie zwischen den ATIs 0.19 und 0.53 (94,4%), CMX1/3 und CMX2 (99,2%), CM1 und CM2 (90,3%) sowie CM16 und CM17 (87,4%) ist sehr groß, visualisiert anhand der Länge der verbindenden Linien (je kürzer desto ähnlicher). Die ATIs WASI und WTI haben nahezu keine Homologie zu den anderen ATIs (5).

angereicherte Proben. Für inhibitorische Tests oder klinische Assays werden bereits Proben eines bestimmten ATI in hoher Konzentration verwendet, allerdings sind hierbei immer auch andere ATIs mit im Spiel (65).

ATIs hemmen Amylasen und Trypsin verschiedensten Ursprungs. Es wurde bereits gezeigt, dass Wasserauszüge von gewöhnlichem Weizenmehl die Amylase-Aktivität erwachsener Schadinsekten, z.B. des Mehlkäfers oder der deutschen Kakerlake reduzieren, allerdings nicht im Falle des Bockkäfers oder der Mehlmotte (66). Diese Studie basierte auf *in vitro* Experimenten erwachsener Insekten-Populationen. Ein anderes *in vivo* Experiment mit den Larven des Rotbraunen Reismehlkäfers und des Bohnenrüsselkäfers zeigte, dass ATIs das Wachstum der Larven des Bohnenrüsselkäfers stärker beeinflussten als beim Reismehlkäfer (67). Aus diesem Grund wurde erstmals angenommen, dass ATIs tatsächlich eine protektive Funktion in der Pflanze einnehmen, allerdings haben einige Insektenarten Mechanismen entwickelt ATIs zu entgiften. Die inhibitorische Aktivität von ATIs auf Enzyme von Säugetieren ist umstritten. Wasserauszüge aus Weizenmehl schränkten bei Affen oder

Meerschweinchen die Amylase-Funktion nicht ein, aber die des Menschen (Speichel und Pankreas) sowie des Huhns (66). Eine weitere Studie zeigte eine nicht näher beschriebene Mischung von ATIs, welche die Aktivität der speichelständigen Amylase des Menschen um das Hundertfache stärker hemmte als die pankreasständige Amylase (68). Soja- und Erbsenmehl haben eine deutlich stärkere Trypsin-inhibierende Aktivität als Weizenmehle (69, 70). Eine Studie verglich die Trypsin-inhibierende Aktivität von Sojamehl mit Weizengluten. Dies offenbarte eine zehnfach höhere inhibitorische Aktivität des Sojamehls verglichen mit dem Gluten des Weizens (69). Obschon Weizengluten sich im Aufbau von Weizenmehl sehr unterscheidet, können beide annähernd gleiche ATI-Anteile vorweisen, von etwa drei Prozent (71). Verglichen mit Weizen weisen die Soja-Trypsin-Inhibitoren eine deutlich stärkere Hitzeempfindlichkeit auf und können inaktiviert werden, z.B. durch Rösten (69).

Die absolute Quantifizierung von Proteinen birgt viele Schwierigkeiten. Eine sehr komplexe und große Studie untersuchte die verschiedenen Bestandteile des Weizen-Proteoms in der 2D-Gel-Elektrophorese und ordnete sie anhand der entstehenden Protein-Felder mit Hilfe von Proteasen (4). Die verschiedenen Proteine jedes einzelnen Feldes wurden mittels Massenspektrometrie analysiert. Diese Technik erfordert eine große und idealerweise komplette Protein-Datenbank, die für viele Pflanzen gar nicht existiert. Außerdem ist der Größenvergleich verschiedener Proteinfelder über Elektrophorese-Gele nicht so genau wie andere Verfahren, die auf der Massenspektrometrie basieren, da die Intensität des Feldes auch von der Bindungsfähigkeit des Färbemittels mit beeinflusst wird. Verglichen mit allen anderen Weizenproteinen konnten 4,1% der Felder ATIs zugewiesen werden (4). Bei einem Gesamtproteinanteil des Weizens von etwa 10%, machen ATIs circa 4mg pro Gramm Weizen aus. In der ausgewählten Weizensorte (Butte 86) war der ATI-Typ 0.19 mit 15% am häufigsten im Vergleich zu allen anderen ATI-Typen. Der Typ CMX2 verbuchte den geringsten Anteil aller ATIs mit circa 1%. Es ist anzumerken, dass die beschriebene Verteilung nur für die Sorte Butte 86 analysiert wurde und das Proteinmengen sowohl von der Genetik als auch von den Umweltbedingungen abhängt. Eine Studie untersuchte diese Effekte bei dem ATI-Typ CM3 im Hartweizen, auch mittels Massenspektrometrie und zeigte auf, dass die Anbaubedingungen den CM3-Gehalt deutlicher beeinflussen als der genetische Hintergrund (72). In Abbildung 10 sehen wir die durchschnittliche Verteilung verschiedener ATI-Typen in der

analysierten Weizensorte, hierbei handelt es sich um mehr als zehn verschiedene ATI-Typen, die in unterschiedlichen prozentualen Mengen vertreten sind.

Die An- bzw. Abwesenheit von ATIs in Urgetreiden ist teilweise bestätigt. Im Emmer wurden ATIs gefunden, die ähnliche Aminosäure-Sequenzen wie die Weizen-ATIs CM2, CM3 und CM16 aufweisen (73). Im Einkorn wurden ATI-kodierende Gene entschlüsselt, diese sind aber nicht exprimiert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Gene möglicherweise stumm seien oder nur auf sehr niedriger Stufe aktiviert, was einen Nachweis von ATIs im Einkorn-Protein unmöglich machte. Eine Ursache könnten Mutationen sein, welche die Translation von Proteinen blockierten (52).

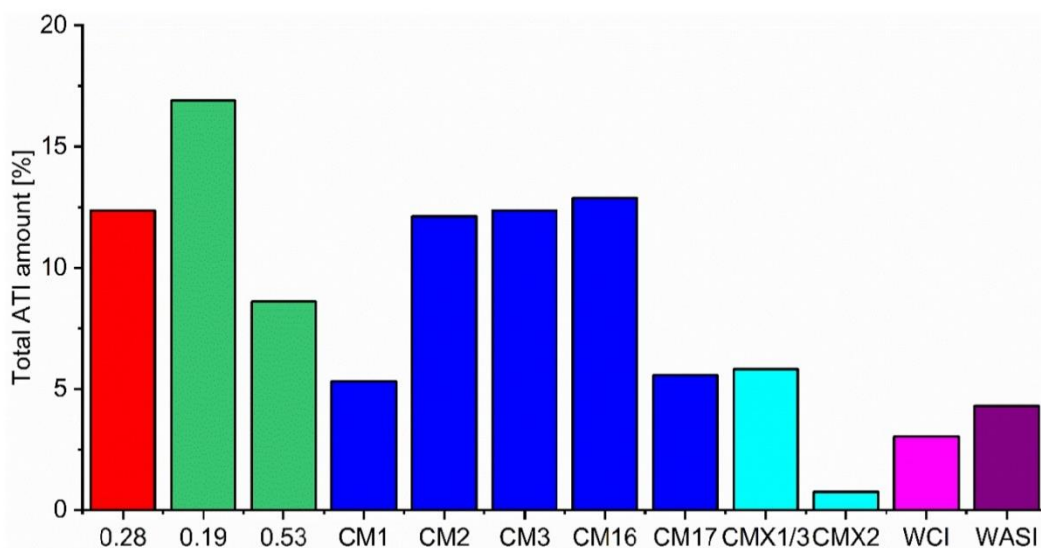


Abbildung 9: Prozentuale Verteilung von α -Amylase/Trypsin Inhibitoren (ATIs) im gewöhnlichen Weizen der Sorte Butte 86 (Summe aller ATIs = 100 %). Die Abbildung wurde modifiziert aus (3). Die Ergebnisse basieren auf 2D-Gel Elektrophorese und Vergleich von Feldergröße/-volumen (3, 4). Das angewandte Verfahren war die Massenspektrometrie. Der ATI 0.19 war reichlich vertreten mit über 15%. Die ATIs 0.28, CM2, CM3 and CM16 waren in etwa gleich verteilt mit über 10%. CMX2 war am wenigsten vertreten mit etwa 1%. Die verbliebenen ATIs 0.53, CM1, CM17, CMX1/3, WCI und WASI kamen auf 3-7%.

3 Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Isolation der Neutrophilen Granulozyten aus Spender-Vollblut

Das Spenderblut wurde mittels einer Omnifix Einwegspritze sowie einem Venenpunktionsbesteck gewonnen. Zuvor wurden in die Einwegspritze 5.000 I.E. Heparin-Natrium aufgezogen, es wurden anschließend 20-25ml Vollblut entnommen. Das entnommene Blut wurde immer am Tag der Blutentnahme weiter aufbereitet. Zunächst wurden Blut und Dextran-Lösung 1:1 in 15ml Falcons durch Schwenken invertiert, danach wurden die Falcons für 30min stehend gelagert, um eine Sedimentation der Erythrozyten zu erzielen. Im Anschluss wurde mithilfe von Histopaque-1077 eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Die vorbereiteten Falcons wurden für 30min in eine Zentrifuge gegeben (1.700 rpm, Bremse 1). Durch die Zentrifugation entstand am Boden des Falcons ein gelbliches Zellpellet. Dieses wurde mit ACK-Puffer je zweimal resuspendiert sowie zentrifugiert. Die Absicht dahinter war die noch verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Zur weiteren Behandlung der Zellpellets erfolgte eine Resuspendierung mit 37°C warmen TM3, einem selbst hergestellten Nährmedium bestehend aus Iscove's Medium, 3% FCS, 1% Glutamin und 1% Natriumpyruvat. Mithilfe einer Neubauer Zählkammer sowie Trypanblau wurden 10µl Zellsuspension mit 90µl Trypanblau vermengt und die Lebendzellzahl unter einem Mikroskop bestimmt. Ausgezählt wurden alle vitalen PMN in 2 Großquadraten der Neubauer Zählkammer unter Beachtung des L-Randes. Für die Berechnung der Zellzahl wurde der Mittelwert der beiden Großquadrate mit dem Kammerfaktor (10^4), der Verdünnung ($\times 10$) und dem Gesamtvolumen der Zellsuspension multipliziert.

3.1.2 Inhibitor-Behandlung und Stimulation der aufgereinigten PMN

Für die folgenden Versuche wurden PMNs in technischen Duplikaten auf einer 96-Well-Platte angesetzt, aktiviert und die Effektorfunktionen analysiert.

3.1.2.1 Behandlung mit dem TLR4-Inhibitor CLI-095

Aufgereinigte neutrophile Granulozyten wurden für 45min bei 37°C mit CLI-095 inkubiert, bevor die Zellen im Anschluss stimuliert wurden. Der TLR4-Inhibitor wurde ebenfalls im Nährmedium TM3 gelöst (Stock-Substanz 1mM). Eingesetzt wurde eine Endkonzentration von 5µM/ml. Um einen alleinigen Effekt von CLI-095 auf die PMN auszuschließen, wurde eine Kontrolle mit nicht aktivierten, aber TLR4-blockierten Zellen für jedes Experiment durchgeführt.

3.1.2.2 Stimulation mit ATI und hitzebehandeltem ATI

Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI) wurden von der AG Schuppan aus Weizen gewonnen. Die gewonnenen Mengen wurden im Anschluss durch Titration bestimmt und die Konzentration des Stocks bestimmt. Die Endkonzentrationen, die zum Einsatz kamen, waren 5µg/ml sowie 50µg/ml. Die Hitzebehandlung wurde im eigenen Labor mit Hilfe eines Heizblocks durchgeführt. Hierzu wurde ein Teil der Stock-Substanz für 10min bei 90°C auf dem Heizblock behandelt. Um eine Verdunstung des Wasseranteils zu vermeiden und so die Konzentration zu verändern, geschah dies in geschlossenen Eppendorf-Gefäßen. Bei den hitzebehandelten ATI [im Folgenden auch als hitzeinaktivierte ATI (hiATI) bezeichnet] handelt es sich um die gleichen zwei Konzentrationen. Die ATI wurden mit Hilfe von TM3 auf die gewünschten Zielkonzentrationen gebracht. Die ATI-TM3-Mischungen (unbehandelt sowie hitzebehandelt) wurden stets frisch aus Stock unter der Sterilbank hergestellt. Zur Stimulation von 2×10^6 PMN/ml wurden die ATI in Lösung auf die Zellsuspension gegeben und für 45min bei 37°C inkubiert. Auch die zuvor TLR4-blockierten Zellen wurden nun mit ATI behandelt und kamen nun zur Aktivierung für 45min in den Inkubator.

3.1.2.3 Weitere Stimulanzen

Als Positivkontrolle wurden folgende Stimulanzen mitgeführt: 50ng/ml PMA (= Phorbol-12-myristat-13-acetat), einem Aktivator der Proteinkinase C sowie 1 µg/ml LPS, einem TLR-4 Agonisten. Welche dieser Stimulanzen für die einzelnen Experimente Verwendung findet, wird entsprechend erwähnt.

Für manche Analysen wurde darüber hinaus eine Stimulation mit 50ng/ml GM-CSF (granulocyte monocyte–colony stimulating factor), ein bei PMN antiapoptotisch wirkendes Zytokin, durchgeführt.

3.1.3 Herstellung von Proteinlysaten aus aktivierten PMN

Nach der Aufreinigung der neutrophilen Granulozyten wurden 10×10^6 Zellen/ml in TM3 für die Proteinisolierung eingesetzt. Die Zellen wurden analog zum Versuch auf der Wellplatte mit den entsprechenden Konzentrationen der Stimulanzen aktiviert und für 10min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (1min, 13.000rpm) bei welcher die PMN auf 4°C abgekühlt wurden. Im Folgenden wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (2min, 1.800rpm). Anschließend erfolgte die Behandlung mit dem Lysepuffer und die Zellen wurden für 30min auf Eis inkubiert. Um optimale Lysebedingungen zu erzielen, wurde der Harnstoff-Lysepuffer mit 100mM PMSF und Proteinaseinhibitor versetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 13.000rpm zentrifugiert, um die im Überstand befindlichen zytoplasmatischen Proteine von Zellkern- und Zellmembranbestandteilen im Pellet abzutrennen. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce™ 660nm Protein Assay Reagent (10µl 1:2 und 1:5 verdünnte Proteinprobe + 150µl Reagenz je als Doppelbestimmung) bei einer Absorption von 660nm im Vergleich zu einer Protein-Standardgeraden (0-2mg/ml BSA) quantifiziert (Tecan Reader SpectraFluor Plus). Dies ist ein Assay, der auf der Methode von Bradford beruht (74).

3.1.4 SDS Gel-Elektrophorese und Western Blot-Analyse

Um Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Molekülmasse aufzutrennen, fand die SDS-PAGE (englisch: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) Anwendung. Das anionische Tensid SDS wird benötigt, um die Eigenladung aller Proteine zu überdecken, sodass sie eine konstante negative Ladung aufweisen, damit alle Proteine im elektrischen Feld in dieselbe Richtung wandern. Getrennt werden die Proteine über ein Gel auf Polyacrylamidbasis, in welchem kleinere Proteine schneller durch die Poren des Gels wandern als größere (75, 76). Das Gel setzt sich für die meisten Proteine aus einem 4% Sammelgel (3,2ml dH₂O, 1,25ml 0,5M TRIS pH6,8, 50µl 10% SDS, 0,5ml 40% Polyacrylamid, 5µl TEMED und 25µl 10% APS) und einem

12% Trenngel (4,3ml dH₂O, 2,5ml 1,5M TRIS pH6,8, 100µl 10% SDS, 3ml 40% Polyacrylamid, 15µl TEMED und 75µl 10% APS) zusammen.

Für die SDS-PAGE werden 10µg/ml Protein eingesetzt, die mit 4x SDS Ladepuffer (DTT-haltig) versetzt und anschließend für 10min bei 95°C auf dem Heizblock erhitzt wurden, um die Proteine zu denaturieren. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt für ca. 20min bei 25mA (Sammelgel) und etwa 1h bei 40mA (Trenngel) in einer Mini-Protean 3 Cell Gelelektrophoresekammer. Anschließend werden die Proteine aus dem gesamten Gel auf eine mit Methanol vorbehandelte (2-5min) 0,45µM PVDF Membran mit Hilfe eines elektrischen Gerätes, dem Trans Blot Turbo System der Firma BioRad, durch Stromanlegung über einen Zeitraum von 30min bei Programm 2 (aus vorprogrammierter Liste seitens des Herstellers) transferiert. Aufgebaut wird der Blot von unten nach oben wie folgt: 3x mit Blotpuffer befeuchtetes Filterpapier, PVDF Membran, Gel, 3x mit Blotpuffer befeuchtetes Filterpapier. Prinzip des Western Blots ist die Übertragung der negativ geladenen Proteine von der Gelmatrix auf die Membran durch einen elektrischen Fluss. Anschließend werden die freien Bindungsstellen der geblotteten Membran für mindestens 30min in 5% BSA (verdünnt mit TBST) oder mit 5% Milchpulver blockiert (abhängig vom Primärantikörper) und dann über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler mit dem Primärantikörper inkubiert (verdünnt in TBST mit 5% BSA oder 5% Milchpulver). Am nächsten Tag wird die Membran 3x 5min mit TBST gewaschen und daraufhin mit einem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (in TBST mit 5% BSA oder 5% Milchpulver) für 1h bei RT inkubiert. Folgende Primärantikörper wurden verwendet: β-actin (1:1.000 in 5% BSA), AKT (1:1.000 in 5% BSA), phospho-AKT (1:1.000 in 5% BSA), p38 (1:1.000 in 5% BSA), phospho-p38 (1:1.000 in 5% BSA), ERK1/2 (1:1.000 in 5% BSA), phospho-ERK1/2 (1:500 in 5%-iger Milchpulverlösung), SAPK/JNK (1:1.000 in 5% BSA), phospho-SAPK/JNK (1:1.000 in 5% BSA). Für die meisten Primärantikörper wird ein HRP-konjugierter anti-rabbit Sekundärantikörper (1:1.000 in 5% BSA) verwendet. Ausnahmen hiervon bilden folgende Primärantikörper: β-actin, phospho-ERK1/2. Diese benötigten einen HRP konjugierten anti-mouse Sekundärantikörper (1:1.000 in 5% BSA bzw. für phospho-ERK1/2 in 5% Milchpulver). Visualisiert werden die Proteine über das Pierce™ ECL Western Blotting Detektionssystem über eine Enzym-Substrat Reaktion und quantifiziert über die Quantity One Software V4.4.0 von Chemidoc (77). Die exakte Durchführung dieser Methode bezüglich Bedingungen und Konzentrationen wurde in der Vergangenheit bereits etabliert (78).

3.1.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS = englisch: fluorescence activated cell sorting) können Zelleigenschaften analysiert, sowie die Bestimmung von Oberflächen- und/oder intrazellulären Antigenen von Zellen bestimmt werden. In diesem Fall speziell von PMN. Während die aufgereinigten und stimulierten Zellen durch eine Kammer geleitet und von verschiedenen Lasern bestrahlt werden, entsteht Streulicht. Das Vorwärtsstreulicht charakterisiert Zellen aufgrund ihrer Größe, das Seitwärtsstreulicht aufgrund ihrer Granularität. Proportional zur Zellgröße und der Anzahl enthaltener Granula ist das Vorwärts-, wie auch das Seitwärtsstreulicht größer (79, 80). Als weitere Anhaltspunkte dienen beispielsweise Art, Reife und Aktivierungszustand der Zellen. Man kann die Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern färben, um sie durchflusszytometrisch analysieren zu können. Nach entsprechender Färbung werden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und dann am LSR II Durchflusszytometer gemessen. Dabei kann die Fluoreszenz über 4 verschiedene Laser angeregt werden, sodass mehrere Farben gleichzeitig gemessen werden können. Zur Auswertung wird die FACS Diva und FlowJo Software genutzt sowie im weiteren Verlauf das Programm Excel von Microsoft. Im Rahmen meiner Versuchsansätze habe ich mithilfe der FACS-Methode das Phagozytose- wie auch das Degranulationsverhalten untersucht.

3.1.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Methode des ELISA basiert auf dem Prinzip Antigene eines bestimmten Stoffes über Antikörper nachzuweisen. Die Detektion erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion. Erstmals beschrieben wurde diese Technik 1971 von Engvall und Perlmann (81). Über Nacht wird der Coating Antikörper (Primärantikörper) bei Raumtemperatur (RT) an eine 96-Well-Flachbodenplatte gebunden. Am folgenden Tag (ca. 12-14h später) wird die Platte 3-mal mit Waschpuffer gewaschen (zwischen jedem nachfolgenden Schritt erfolgt ebenfalls eine dreimalige Waschung mit Waschpuffer) und dann mit Blockpuffer (1h bei RT) alle freien Bindungsstellen blockiert. Anschließend können die Zellüberstände aus den Versuchsreihen (1:10

verdünnt) sowie der Standard (Verdünnungsreihe) in Duplikaten zugegeben werden. Im Anschluss wird die Platte 2h bei RT inkubiert.

Die an den Primärantikörper gebundenen Zytokine des Probenmaterials werden im darauffolgenden Schritt mit einem Sekundärantikörper – sog. „detection antibody“ – welcher an ein weiteres Antigen-Epitop der Zytokine bindet, inkubiert (2h bei RT). Nach der vorletzten Waschung erfolgt eine 20-minütige Inkubation mit 1:1.000 – in Blockpuffer verdünntem – Streptavidin-HRP (englisch: horseradish peroxidase) bei RT. Das Streptavidin bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers.

Mittels HRP kann über ein chromogenes Substrat (Tetramethylbenzidin) die Menge an Zytokinen im Zellüberstand detektiert werden. Nach der letzten Waschung wird die Reaktion mit H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 450nm im Tecan Reader gemessen.

Über eine in Excel berechnete Standardgerade, lässt sich die Konzentration an Zytokinen im Zellüberstand in pg/ml bestimmen.

3.1.7 Bestimmung der Effektorfunktionen von Neutrophilen Granulozyten (PMN)

3.1.7.1 Oxidativer Burst

Unter oxidativem Burst versteht man die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch PMN. Die Sauerstoffradikale können vom DCFH-DA (2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat) ein Wasserstoffatom abspalten, was eine Detektion ermöglicht, da es grün zu fluoreszieren beginnt.

Aktivierete PMN setzen deutlich mehr Sauerstoffradikale frei als unstimulierte Zellen wodurch mittels oxidativen Bursts der Aktivierungszustand der PMN gemessen werden kann.

Man setzt für den oxidativen Burst 2×10^6 PMN/ml in Anwesenheit titrierter Dosen von ATI 5µg/ml bzw. 50µg/ml sowohl in unbehandelter als auch hitzebehandelter Form ein, zusätzlich erfolgt eine Stimulation mit PMA und LPS. Ebenso bestimmt man den oxidativen Burst nach gleichem Schema für TLR4-blockierte PMN.

Anschließend werden die Zellen mit DCFH-DA (1:15.000) inkubiert und das Freisetzungsverhalten von Sauerstoffradikalen durch die PMN mit Hilfe einer Kinetik

über die auftretende Fluoreszenz für eine Dauer von 180min alle 5min intermittierend (entspricht 35 Zyklen) mit dem Tecan Reader gemessen. Für die Auswertung errechnet man über den Mittelwert die oxidative Burstaktivität bzw. die spezifische Fluoreszenzintensität (SFI) indem man die Fluoreszenz der nicht stimulierten Kontrollen von der Fluoreszenz der stimulierten Zellen subtrahiert.

3.1.7.2 Degranulation und L-Selektin-Shedding

Zur Detektion der Regulierung von Degranulationsmarkern auf neutrophilen Granulozyten werden isolierte, z.T. mit CLI-095 vorbehandelte sowie u.a. mit PMA, LPS, ATI und hitzebehandelten ATI aktivierte PMN (2×10^6 Zellen/ml) in einer 96-Well-Flachbodenplatte 20min bei 4°C mit folgenden Antikörpern gefärbt: CD11b PE (1:200) und CD66b FITC (1:400) und im Anschluss am LSR II Durchflusszytometer gemessen. Beide Oberflächenmarker sollten bei der Aktivierung von PMN verstärkt exprimiert werden. Ausgewertet wurde der Degranulationsindex, indem durch den Anteil an Degranulation unstimulierter Zellen dividiert wurde.

Eine ebenfalls wichtige Effektorfunktion von PMN ist das L-Selektin-Shedding, welches mit dem Antikörper CD62L APC (1:250) quantifiziert werden kann. CD62L ist ein konstitutiv hoch exprimiertes Adhäsionsmolekül auf PMN, dass bei Aktivierung durch enzymatisches Shedding abgespalten wird. Die Expression von CD62L auf PMN, in An- und Abwesenheit titrierter Dosen PMA, LPS, ATI bzw. hitzebehandeltem ATI, kann ebenfalls nach 20-minütiger Inkubation mit dem Antikörper CD62L bei 4°C, am LSR II quantifiziert werden, und zwar auch in diesem Fall sowohl für die unbehandelten als auch für die mit CLI-095 vorinkubierten PMN.

3.1.7.3 Phagozytose

Neutrophile Granulozyten werden auch als Phagozyten bezeichnet, weshalb die Phagozytose als weitere wichtige PMN-Effektorfunktion bestimmt wurde. Hierzu werden auch isolierte und mit ATI behandelte und/oder stimulierte PMN benötigt, die dann mit PE-gelabelten Polystyrene-Beads (1:100, Polysciences Inc.) nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C am LSR II gemessen werden. Quantifiziert wird die Aufnahme von Beads durch die neutrophilen Granulozyten und die anteilig phagozytierte Menge der Beads ausgewertet.

3.1.7.4 Interleukin-8 (IL-8)-Sekretion

Zur Bestimmung der IL8-Sekretion dienten PMN auf der 96-Well-Platte für die Degranulations-Analyse. Nach der letzten Zentrifugation (2min, 1.800rpm) der Zellen sowie Inkubation bei 37°C über Nacht und vor Hinzufügen der Antikörper, wurden die Überstände (pro Well jeweils 100µl) abpipettiert und eingefroren. Später wurden die Zellüberstände schonend aufgetaut und auf ihre Menge sezerniertes IL-8 mit Hilfe von käuflich erwerbbaaren ELISA-Kits detektiert. Die Durchführung erfolgte wie in der Methodenbeschreibung „ELISA“ angeführt.

3.2 Material

3.2.1 Spenderkollektiv

Im Zeitraum vom 23.03.2017 bis 30.06.2017 beteiligte sich eine Gruppe gesunder Spender freiwillig am Forschungsprojekt ATI. Sie befanden sich zu diesem Zeitpunkt in den Versuchsräumen und wurden dort nach vorausgegangener eingehender Aufklärung punktiert. Hierbei wurden zu Forschungszwecken personenbezogene Daten mit schriftlicher Einwilligung erhoben. Als einziges Einschlusskriterium galt subjektiv empfundene Gesundheit und keine kürzlich stattgefundenene Infektion, Ausschlusskriterium war jedwede Form akuter oder kürzlich zurückliegender Erkrankung sowie subjektiv empfundene Krankheit.

3.2.2 Versuchsräumlichkeiten

Die experimentelle Arbeit fand am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz statt. Für alle Messungen wurden Geräte aus diesem Institut verwendet.

3.2.3 Verwendete Materialien

3.2.3.1 Verwendete Chemikalien, Stimulantien und Kits

- 10% APS (Fluka, Sigma Aldrich, München)
- 40% Acrylamid-Bisacrylamid Stammlösung 29:1 (Roth, Karlsruhe)

- Albumin Fraktion V proteasefrei (=BSA) (Roth, Karlsruhe)
- Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe)
- CHAPS (Roth, Karlsruhe)
- DCFH-DA (Sigma-Aldrich, München)
- DTT (Roth, Karlsruhe)
- DMSO (Roth, Karlsruhe)
- 70% Ethanol (Roth, Karlsruhe)
- FCS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)
- L-Glutamin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)
- Glycin (Roth, Karlsruhe)
- Glucose (Merck, Darmstadt)
- Harnstoff (Roth, Karlsruhe)
- HCl (Roth, Karlsruhe)
- Heparin-Natrium 25000 (Ratiopharm, Ulm)
- Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, München)
- H₂SO₄ (Roth, Karlsruhe)
- IL-8 ELISA Kit (human) (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt)
- LPS von Salmonella typhimurium (Sigma-Aldrich, München)
- β-Mercaptoethanol (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)
- Methanol (Roth, Karlsruhe)
- Milchpulver (Roth, Karlsruhe)
- Natriumcitrat (Roth, Karlsruhe)
- Natriumpyruvat (Serva, Heidelberg)
- NaCl 0,9% (B.Braun, Melsungen)
- NaCl (Roth, Karlsruhe)
- NaOH (Roth, Karlsruhe)
- PMA (Sigma-Aldrich, München)
- PMSF (Roche, Mannheim)
- Proteinase Inhibitor Kit (Sigma-Aldrich, München)
- Roti®-Histofix 4% (Roth, Karlsruhe)
- SDS (Roth, Karlsruhe)
- Terralin (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt)

- TEMED (Roth, Karlsruhe)
- Thioharnstoff (Roth, Karlsruhe)
- Tris (Roth, Karlsruhe)
- Triton X-100 (Roth, Karlsruhe)
- Trypanblau (Roth, Karlsruhe)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, München)

3.2.3.2 Selbst angesetzte Medien, Puffer und Lösungen

- Dextran-NaCl-Lösung:
 - 3,8g Dextran auf 100ml 0,9% NaCl, bei 150°C aufkochen und lösen lassen
- Testmedium 3% (TM3):
 - Iscove's Medium
 - 3% FCS
 - 1% Glutamin
 - 1% Natriumpyruvat
- Ammonium-Chloride-Potassium (ACK)-Puffer:
 - 0,1 Millimol pro Liter (mM) EDTA
 - 150 mM Ammoniumchlorid (NH₄Cl)
 - 1 mM Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO₃)
 - in Wasser (pH 7,3)
- Phosphate Buffered Saline (PBS):
 - 1,4 Mol (M) Natriumchlorid (NaCl)
 - 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄)
 - in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) pH 7,2
- PBS-Tween:
 - PBS + 0,05% Tween

- Tris-Buffered Saline (TBS):
 - 20mM Tris
 - 150mM Natriumchlorid (NaCl)

- TBS-Tween:
 - TBS + 0,05% Tween

- FACS-Puffer:
 - 1% bovines Serumalbumin (BSA)
 - 0,01% Natrium-Acetat
 - 1 mM EDTA
 - in PBS

- ELISA-Blockpuffer:
 - PBS + 1% BSA
 - 0,05% Tween-20

- ELISA-Waschpuffer:
 - PBS + 0,1% Tween-20

- ELISA Reagent Diluent:
 - 0,1% BSA in TBS-Tween

- Stop Solution:
 - 2M H₂SO₄

- Harnstofflysepuffer:
 - 7M Urea
 - 2M Thiourea
 - 5mM Dithiothreitol (DTT)
 - 2%-iges CHAPS-Detergens

- SDS-Ladepuffer (Vierfachkonzentrat):

- 0,2M Tris
 - 8% SDS
 - 40% Glycerol
 - 4% Bromphenolblau
 - 0,1M DTT in Aqua dest., pH 6,8
- SDS-Laufpuffer (Zehnfachkonzentrat):
- 0,25M Tris
 - 1,9M Glycin
 - 1% SDS in Aqua dest., pH 8,6
- Blotpuffer (Zehnfachkonzentrat):
- 250mM Tris
 - 1,9M Glycin in 1000ml Aqua dest.
- Blotpuffer (Anwendungskonzentration):
- 200ml Ethanol
 - 700ml Aqua dest.
 - 100ml Blotpuffer (10-fach)
 - 400µl 10%-iges SDS
- Stripping Puffer (Fünffachkonzentrat):
- 16g TrisBase
 - 203g Tris HCl
 - 100g 10%-iges SDS auf 1000ml H₂O, pH 6,8

3.2.3.3 FACS Antikörper (anti-human)

Tabelle 3: Auswahl an verwendeten FACS-Antikörpern

<i>Antigen (Verdünnung)</i>	<i>Klon</i>	<i>Markierung</i>	<i>Firma</i>
CD11b (1:200)	ICRF44	PE	BioLegend
CD62L (1:250)	DREG-56	APC	BioLegend
CD66b (1:400)	80H3	FITC	Miltenyi Biotec

3.2.3.4 Western Blot Antikörper (anti-human)

Tabelle 4: Auswahl an verwendeten Western Blot Antikörpern

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Firma</i>	<i>Verdünnung</i>
<i>anti-β-Actin-Peroxidase</i>	AC-15	Sigma-Aldrich	1:1000
<i>anti-Akt</i>	C67E7	Cell Signaling	1:1000
<i>anti-SAPK/JNK</i>	56G8	Cell Signaling	1:1000
<i>anti-p38 MAPK</i>	polyklonal	Cell Signaling	1:1000
<i>anti-p44/42 MAPK</i>	polyklonal	Cell Signaling	1:500
<i>anti-phospho-Akt</i>	193H12	Cell Signaling	1:1000
<i>anti-phospho-SAPK/JNK</i>	81E11	Cell Signaling	1:1000
<i>anti-phospho-p38 MAPK</i>	3D7	Cell Signaling	1:1000
<i>anti-phospho-p44/42 MAPK</i>	E10	Cell Signaling	1:500
<i>anti-mouse IgG HRP linked Ak</i>	-	Cell Signaling	1:1000
<i>anti-rabbit IgG HRP linked Ak</i>	-	Cell Signaling	1:1000
<i>Streptavidin HRP</i>	-	R&D Systems	

3.2.3.5 Reagenzien

Verwendete Reagenzien und eingesetzte Konzentrationen:

- Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI) [5µg/ml]; [50µg/ml] (zur Verfügung gestellt von der AG Schuppan, aus eigener Herstellung)
- *S. typhimurium* Lipopolysaccharid (LPS) [1µg/ml] (Sigma Aldrich, München)
- PMA [1:500] (Sigma Aldrich, München)
- Polymyxin B [1µg/ml] (ThermoFisher Scientific, Waltham)
- TLR4-Inhibitor (CLI-095) [5µM/ml] (Invivogen, Toulouse)
- GM-CSF [1:5000] (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt)
- Dichlorfluorescein (DCF) [1:15000] (Sigma Aldrich, München)
- PE Beads [1:200] (Polysciences Inc., Warrington)

3.2.3.6 Verbrauchsmaterialien

- Omnifix 30ml Einwegspritze (B. Braun, Melsungen)

- Perfusorspritze 50ml (B. Braun, Melsungen)
- Einweg-Handschuhe (Roth, Karlsruhe)
- Entsorgungsbeutel (Roth, Karlsruhe)
- FACS-Röhrchen 5ml (Falcon BD, Corning)
- Pipettenspitzen (StarLab; Hamburg)
- Plastikröhrchen mit Schraubverschluss (Greiner, Kremsmünster)
- Pur-Zellin Zellstofftupfer (Hartmann, Heidenheim)
- Sarstedt Multiadapter (Sarstedt, Nümbrecht)
- Venofix®-Venenpunktionsbesteck (B.Braun, Melsungen)
- Human CXCL8/IL-8 DuoSet ELISA, 5 plate (R&D Systems, Minneapolis)
- PMSF (Roche, Mannheim)
- Proteinase-Inhibitor-Kit (Sigma Aldrich, St. Luis)
- 10% SDS (Roth, Karlsruhe)
- Rotiphorese® Gel 40 (37, 5:1) (Roth, Karlsruhe)
- Temed (Roth, Karlsruhe)
- APS (Fluka, München)
- Histopaque®-1077 (Sigma Aldrich, St. Luis)

3.2.4 Gerätschaften

- Kanülenabwurfsammelbehälter (Sharpsafe, Dahlhausen)
- Gefäßständer (Neolab, Heidelberg)
- Inkubator incu safe (Sanyo, Osaka)
- Kühlschrank (Liebherr, Kirchdorf an der Iller)
- Reaktionsgefäße (Greiner, Kremsmünster)
- Venenstauschlauch (Med Comfort, Bad Wünnenberg)
- Vortex (Bender & Hobein AG, Bruchsal)
- Invers-Mikroskop AE20 (Motic, Wetzlar)
- Zählkammer Neubauer improved (Diverse Hersteller)
- Fluor Plus, infinite F200 pro (Tecan-Reader, Männedorf)
- Chemidoc XRS (BioRad, München)
- Durchflusszytometer: FACS LSR II (BD Biosciences, Heidelberg)
- CO₂ Inkubator Model MCO-20AIC (Sanyo, Osaka)

- Elektrophoresis Power Supply- EPS 3500 XL
(Pharmacia Biotech, Piscataway, USA)
- Elektrophoresekammern Mini-Protean 3 Cell (BioRad, München)
- ELISA-96-Well Platten Waschgerät (Tecan-Reader, Männedorf)
- Heizblock: Rotilabo®-Blockthermostat Modell H 250 (Roth, Karlsruhe)
- Heizplatte mit Magnetrührer: Ret basic (IKA Labortechnik, Staufen)
- Mehrkanal-Pipetten: 20-200 µl (Gilson, Middleton)
- Mehrkanal-Pipetten 5-50 µl (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Mikroliter-Pipetten: 0,2-2 µl, 1-10 µl, 2-20µl, 10-100 µl, 100-1000 µl
(Gilson, Middleton)
- pH-Meter Typ CG 840 (Schott, Mainz)
- Sterilbank (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Laborzentrifuge Multifuge 3L-R (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Tischzentrifuge Biofuge pico (Hereaus, Hanau)
- Mikrozentrifuge Galaxy MiniStar (VWR, Darmstadt)

3.2.5 Auswertung und statistische Methoden

All meinen Versuchen diente das Programm Microsoft Office Excel 2010 als Auswertungsgrundlage. Hierüber wurden bei jedem Versuch der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Ergänzende Methoden werden bei dem jeweiligen Versuch erwähnt. Zur Erstellung der Grafiken und zur Durchführung von statistischen Analysen nutzte ich das Programm GraphPad Prism (Version 5). Um mehrere Gruppen zu vergleichen, wurde die zweifache Varianzanalyse mit Bonferroni-Post-Test [two-way analysis of variance (ANOVA) plus Bonferroni's Multiple Comparison Test] mit Hilfe dieser Software berechnet. Die Beurteilung der Signifikanz einzelner Werte erfolgte mithilfe der einfachen Varianzanalyse [one-way analysis of variance (ANOVA) plus Tukey-Test].

Als statistisch signifikant gelten für alle statistischen Analysen p-Werte $<0,05$. Ein solcher Wert besagt, dass die Wahrscheinlichkeit kleiner als 5%, dass der gemessene Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen nur auf einem Zufall beruht.

4 Ergebnisse

4.1 Demografische Daten des Spenderkollektivs

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, beteiligten sich eine Gruppe gesunder Personen am Forschungsprojekt. Insgesamt waren es zehn Personen, 3 männliche und 7 weibliche. Das mittlere Alter betrug 31,7 Jahre.

4.2 Auswirkungen von Weizen Amylase-Trypsin-Inhibitoren auf die Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten

Um die spezifischen Effekte von ATIs auf die Effektorfunktionen von PMN zu beurteilen und toxische Effekte auszuschließen, wurden die aus Vollblut isolierten PMN mit zwei verschiedenen Dosen von ATIs beimpft und die PMN-Aktivierung gemessen. Stimuliert wurden die Zellen hierfür mit verschiedenen Konzentrationen an ATIs sowie PMA und LPS. Zur PMN-Aktivierung mittels ATIs wurden die Konzentrationen ATI5 = 5µg/ml sowie ATI50 = 50µg/ml verwendet. Als Positivkontrollen dienten LPS (1 µg/ml) und PMA (1:2.000).

In der Präsentation der Ergebnisse soll gezeigt werden, inwieweit verschiedene Konzentrationen von ATIs sich generell auf die Effektorfunktionen von PMN auswirken. Im Speziellen handelt es sich hierbei um den bereits genannten oxidativen Burst, die Phagozytose, das Degranulations- bzw. Shedding-Verhalten sowie die IL8-Produktion. Zur Beschreibung der Aktivierungsmuster dienen verschiedene Fluoreszenz-Indices, wie z.B. die MFI (Mittlere Fluoreszenz Intensität). Aufgrund von größerer Spendervariabilität hinsichtlich der Aktivierungsintensität, erfolgte eine Normalisierung von oxidativem Burst und Phagozytose. Hierbei wurde beim oxidativen Burst die Hintergrundaktivität (Kontrolle) von den jeweiligen Interventionsgruppen subtrahiert (SFI, spezifische Fluoreszenz-Intensität, die Kontrolle ist daher 0) und für die Phagozytose wurde die jeweilige Interventionsgruppe zur Kontrolle normalisiert (SFI, spezifischen Fluoreszenz-Index, Kontrolle ist daher 1).

Die oxidative Burst-Aktivität wurde über eine Zeit von 180min gemessen. Der durch PMA und LPS induzierte oxidative Burst galt als Positiv- und Lebendkontrolle. In der Abbildung 10A ist im Vergleich zur (unstimulierten) Kontrolle eine Zunahme des oxidativen Bursts zu verzeichnen. Bereits eine geringere ATI-Konzentration induziert

einen oxidativen Burst, allerdings statistisch nicht signifikant. Eine deutliche und signifikante Zunahme des Bursts ist allerdings für die hohe ATI-Dosis zu beobachten. Das L-Selektin-Shedding (CD62L-Expression) zeigt in der Durchflusszytometrie wie zu erwarten ein signifikantes Shedding (verminderte Oberflächenexpression) für LPS- und PMA-Aktivierung, die ATIs nehmen auch auf das Shedding keinen signifikanten Einfluss (Abbildung 10B).

In der Beurteilung der Phagozytoseaktivität konnte eine deutliche und signifikante Zunahme der Phagozytoseaktivität durch PMA und LPS gemessen werden. Anders als bei der Expression der Oberflächenmarker CD11b, CD66b und CD62L kann man für die Phagozytose eine signifikante Zunahme der Aktivität durch ATIs nachweisen. Obschon die geringe ATI-Dosis hier keine entscheidende Rolle spielt, erfüllt die hohe ATI-Dosis die Bedingungen einer signifikanten Zunahme der Phagozytoseaktivität (Abbildung 10C).

Als wichtige Funktion für die direkte Pathogenabwehr ist die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten bekannt. Mit PMA und LPS aktivierte PMN zeigen eine hohe Phagozytoseaktivität. Neben der Phagozytose sind auch die Degranulation und das L-Selektin Shedding wichtige PMN-Effektorfunktionen für eine suffiziente Pathogenabwehr. Die Expression der Oberflächenmarker CD11b, CD66b und CD62L wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Beide Degranulationsmarker (CD11b und CD66b) waren in der Positivkontrolle – PMA-aktivierte PMN signifikant hochreguliert im Bezug zur (Medium-) Kontrolle (Abbildung 10D und F). Für die ATIs galt dies nicht. Hier konnten die Experimente weder für die niedrige noch für die hohe ATI-Dosis eine vermehrte Expression der genannten Oberflächenmarker nachweisen. Ein nahezu identisches Bild zeigen die Assays für die Expression von CD66b, auch hier zeigte sich kein signifikanter Einfluss der ATIs und auch nicht durch LPS, jedoch unter der Positivkontrolle PMA (Abbildung 10D). Signifikante Veränderungen der Viabilität von PMN durch ATIs wurden im Rahmen der durchgeführten Assays nicht festgestellt (Abbildung 10E). In den Abbildungen wird deutlich, dass die Expression von CD11b durch PMA signifikant zunimmt und für LPS ein Trend zur verstärkten Expression zu beobachten ist (Abbildung 10F). Die IL-8-Sekretion wurde bei über Nacht aktivierten PMN bestimmt, hier zeigte sich eine signifikante Zunahme der IL-8-Sekretion sowohl durch die niedrige als auch durch die hohe ATI-Dosis (Abbildung 10G). Die gezeigten Daten stellen den Mittelwert plus SD von vier unabhängigen

Experimenten (unabhängige Spender) dar ($n=4$), Die Statistik wurde für alle Grafiken mit dem one way ANOVA Test mit Bonferroni Posttest berechnet.

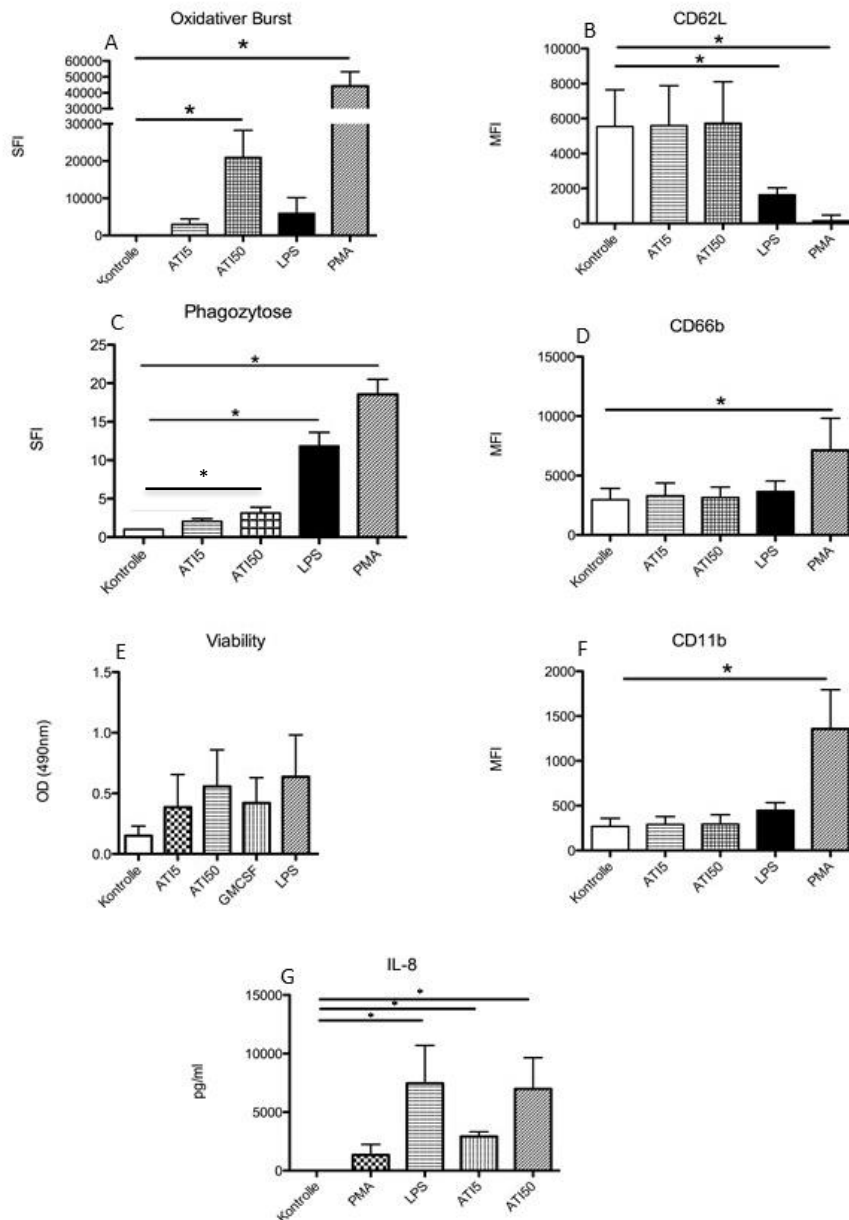


Abbildung 10: Effektorfunktionen von Neutrophilen Granulozyten gesunder Spender*innen nach spezifischer Stimulation. PMNs wurden mit ATIs (5µg/ml und 50µg/ml), LPS (1µg/ml) und PMA (50ng/ml) aktiviert. **A** Oxidativer Burst-Assay nach entsprechender Stimulation. Die oxidative Burst-Kinetik wurde mit DCFH-DA mittels Tecan Reader gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 3h Aktivierung. **B** Durchflusszytometrische Untersuchung des Sheddings (verminderte CD62L-Expression) nach entsprechender Aktivierung. **C** Die Phagozytose-Aktivität wurde anhand der Phagozytose PE-gelabelter Beads nach angeführter Stimulation erhoben. **D** Durchflusszytometrische Untersuchung des Degranulationsverhaltens anhand der CD66b-Expression. **E** Die PMN-Viabilität wurde nach über Nacht Aktivierung mittels MTT-Assay erhoben. **F** Durchflusszytometrische Untersuchung des Degranulationsverhaltens anhand der CD11b-Expression. **G** Die IL-8 Sekretion wurde im Überstand von über Nacht aktivierten PMN gemessen. Signifikante Ergebnisse sind mit „*“ gekennzeichnet (p-Wert < 0,05).

4.3 Hitzebehandlung von ATIs reduziert die Aktivierung von Granulozyten

ATIs zählen strukturell zu den Enzymen. Mittels Hitzebehandlung ist eine Denaturierung und damit Inaktivierung dieser zu erwarten. Im Folgenden wurden ATIs daher hitzebehandelt (90°C für 10min) und der Einfluss auf die Effektorfunktionen der PMNs untersucht.

Die Konzentrationen von ATIs wie auch der hitzebehandelten ATIs sind identisch zu vorherigen Experimenten (ATI5 = 5µg/ml, ATI50 = 50µg/ml). In den Grafiken sind die hitzebehandelten ATIs als „hiATI5“ bzw. „hiATI50“ gekennzeichnet. Hierfür wurden die ATIs vor der Vermengung mit den PMN auf einer Heizplatte für zehn Minuten bei 90°C erhitzt. Nach Abkühlung der ATIs erfolgte die Beimpfung der PMN. Der oxidative Burst war im Vergleich zu den unbehandelten ATIs nach Hitzebehandlung signifikant reduziert (Abbildung 11A). Dies gilt nur für die hohe ATI-Konzentration mit 50µg/ml. Weder die Degranulationsmarker (CD11b und CD66b) noch das L-Selektin-Shedding (CD62L) wurden durch die Hitzebehandlung signifikant verändert (Abbildung 11B, 11D, 11F), wie auch schon im Fall der unbehandelten ATIs (Abbildung 10B, 11D, 11F). In der Beurteilung der Phagozytoseaktivität konnte eine Abnahme der Phagozytoseaktivität beobachtet werden, diese war jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 11C). Die Viabilität der PMNs wurde auch durch die vorherige Hitzebehandlung der ATIs nicht signifikant verändert (Abbildung 11E). Die IL-8-Sekretion von über Nacht aktivierten PMN bleibt auch nach Hitzebehandlung der ATIs auf hohem Niveau, allerdings ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zur IL-8-Sekretion bei unbehandelten ATIs (Abbildung 11G).

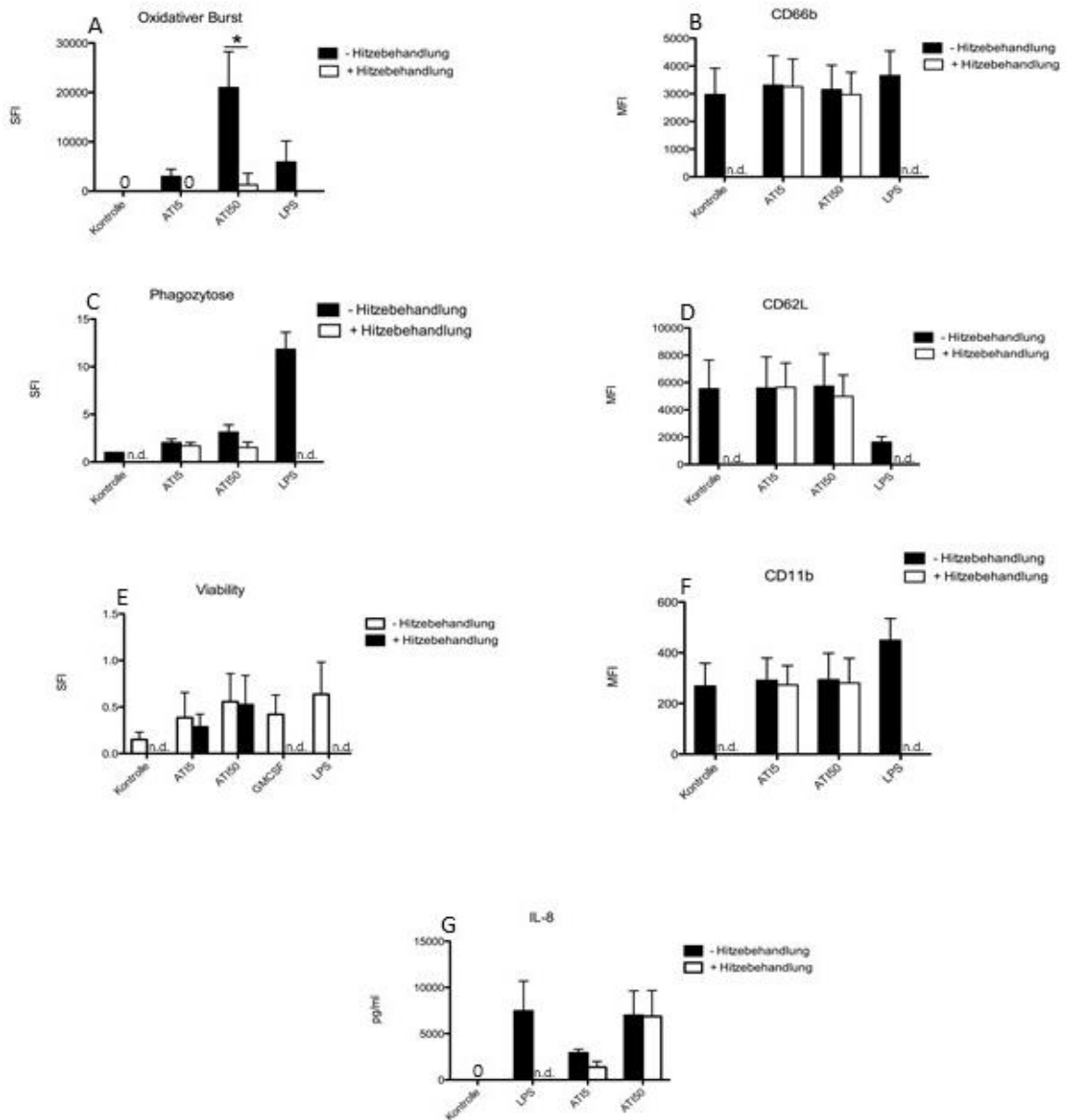


Abbildung 11: Effektorfunktionen von Neutrophilen Granulozyten gesunder Spender*innen nach spezifischer Stimulation. PMNs wurden zusätzlich mit hitzebehandelten ATIs (5µg/ml und 50µg/ml) aktiviert und die jeweilige (Rest-) Aktivität mit den unbehandelten ATIs verglichen. Signifikante Ergebnisse sind mit „*“ gekennzeichnet, 0-Werte sind entsprechend gekennzeichnet, „n.d.“ steht für „nicht durchgeführt“. **A** Oxidativer Burst-Assay nach entsprechender Stimulation. Die oxidative Burst-Kinetik wurde mit DCFH-DA mittels Tecan Reader gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 3h Aktivierung. **B** Durchflusszytometrische Untersuchung des Degranulationsverhaltens anhand der CD66b-Expression. **C** Die Phagozytose-Aktivität wurde anhand der Phagozytose PE-gelabelter Beads nach angeführter Stimulation erhoben. Durch die Hitzebehandlung der ATIs ist eine geringfügige, nicht signifikante Reduktion der Phagozytoseaktivität zu beobachten **D** Durchflusszytometrische Untersuchung des Sheddings (verminderte CD62L-Expression) nach entsprechender Aktivierung. **E** Die PMN-Viabilität wurde nach über Nacht Aktivierung mittels MTT-Assay erhoben. **F** Durchflusszytometrische Untersuchung des Degranulationsverhaltens anhand der CD11b-Expression **G** Die IL-8 Sekretion wurde im Überstand von über Nacht aktivierten PMN gemessen.

4.4 ATIs aktivieren Granulozyten teilweise TLR4-unabhängig

Zum besseren Verständnis des Aktivierungsweges von ATIs wird in diesem Abschnitt auf die Inhibition der TLR4-Rezeptoren eingegangen. Für den Versuchsaufbau wurde hier ein Teil der isolierten PMN zur Seite genommen und für 45min bei 37°C mit dem TLR4-Inhibitor CLI-095 inkubiert (s. Kapitel Material und Methoden). Die Intention dahinter war die Vermutung, dass eine unspezifische Aktivierung des TLR4-Rezeptor durch ATIs erfolgt, dies wurde in anderen Arbeiten bereits gezeigt (65). Durch die Vorbehandlung mit dem TLR4-Inhibitor sollten möglichst alle TLR4-Rezeptorstellen suffizient blockiert und somit die Entfaltung der Wirkung unterbunden werden.

Um eine mögliche Toxizität des TLR4-Inhibitors auszuschließen, wurde zusätzlich die „Kontrolle“ – unstimulierte PMN – mit CLI-095 behandelt, hierbei zeigte sich keinerlei Effekt, siehe hierfür Abbildung 12.

Im oxidativen Burst zeigt sich, wie zu erwarten, eine verminderte Aktivität der LPS-aktivierten PMN nach TLR4-Inhibitor-Vorinkubation, da LPS als Ligand des TLR4-Rezeptors fungiert. Dies war allerdings nicht der Fall für die PMN-Aktivierung mit ATIs, hierauf zeigte sich kein Einfluss durch die Inhibitor-Vorbehandlung (Abbildung 12A).

Auch in den weiteren Assays war die LPS-Kontrolle erfolgreich, sodass sich ebenfalls Degranulation, L-Selektin-Shedding und Phagozytose spezifisch durch CLI-095 inhibieren ließen (Abbildung 12B, C, D, F).

Sehr interessant ist das Ergebnis für die Burstaktivität nach ATI-Aktivierung. Abbildung 12A zeigt eine nahezu unveränderte Burstaktivität der TLR4-blockierten PMNs nach Aktivierung mit ATIs. Dies lässt vermuten, dass TLR4 für die Auswirkungen von ATIs auf die Burstaktivität keine Rolle zu spielen scheint.

Bereits zuvor konnte keine PMN-Aktivierung durch ATIs hinsichtlich CD11b-, CD66b- und CD62L-Expression gemessen werden (Abbildung 10), sodass hierbei auch kein Effekt durch den TLR4-Inhibitor beobachtet werden konnte (Abbildung 12B, D, F).

In der Abbildung 12C sehen wir eine deutlich reduzierte Phagozytoseaktivität durch Inhibition des TLR4-Rezeptors für die PMN-Aktivierung mit hoher ATI-Konzentration. Dies lässt darauf schließen, dass die Phagozytose zumindest teilweise über diesen Pfad gesteuert und beeinflusst wird.

In der Untersuchung der Viabilität zeigte sich diese deutlich reduziert in sämtlichen PMN-Ansätzen, unabhängig von der jeweiligen Stimulation. Dies lässt eine

Beeinträchtigung der PMN-Viabilität durch den TLR4-Inhibitor bei längerfristiger Exposition (über Nacht) vermuten (Abbildung 12E).

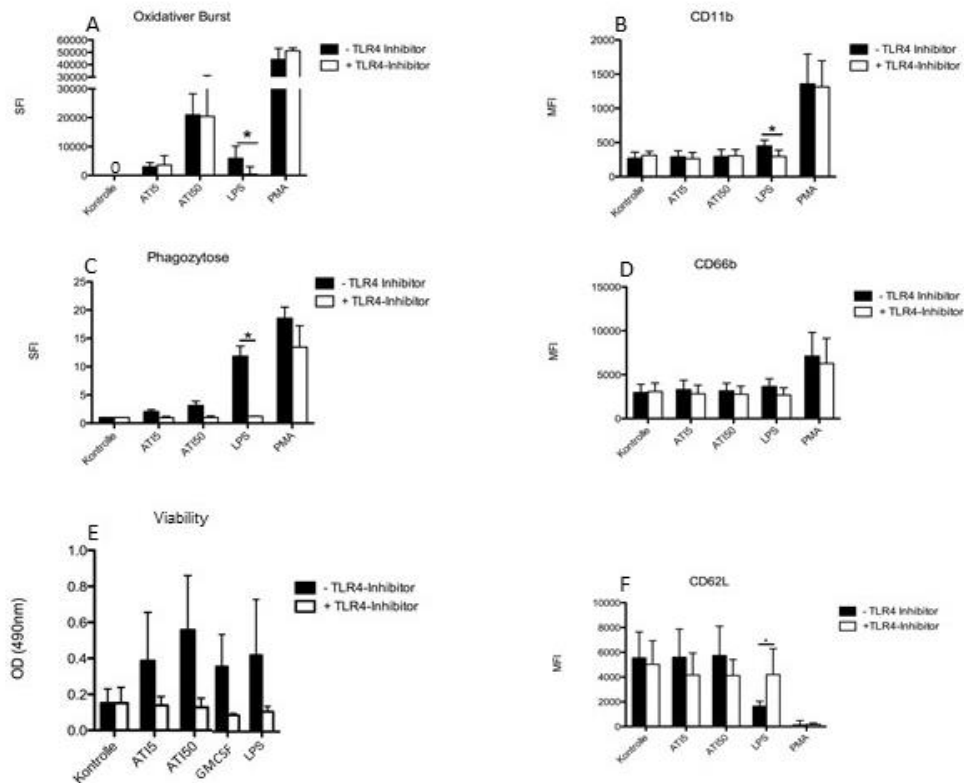


Abbildung 12: Effektorfunktionen von Neutrophilen Granulozyten gesunder Spender*innen nach spezifischer Stimulation. PMNs wurden entweder direkt stimuliert oder zuvor mittels TLR4-Inhibitors (CLI-095) für 45min bei 37°C inkubiert und im Anschluss stimuliert und die jeweilige (Rest-) Aktivität mit den unbehandelten PMN verglichen. Signifikante Ergebnisse sind mit „*“ gekennzeichnet. 0-Werte sind entsprechend gekennzeichnet **A** Oxidativer Burst-Assay nach entsprechender Stimulation. Die oxidative Burst-Kinetik wurde mit DCFH-DA mittels Tecan Reader gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 3h Aktivierung. **B** Durchflusszytometrische Untersuchung des Degranulationsverhaltens anhand der CD11b-Expression **C** Die Phagozytose-Aktivität wurde anhand der Phagozytose PE-gelabelter Beads nach angeführter Stimulation erhoben. Durch die TLR4-Blockade vor Stimulation mit ATIs ist eine signifikante Reduktion der Phagozytoseaktivität zu beobachten **D** Durchflusszytometrische Untersuchung des Degranulationsverhaltens anhand der CD66b-Expression **E** Die PMN-Viabilität wurde nach über Nacht Aktivierung mittels MTT-Assay erhoben. **F** Durchflusszytometrische Untersuchung des Sheddings (verminderte CD62L-Expression) nach entsprechender Aktivierung.

4.5 Aktivierende Effekte von ATI auf PMN sind teilweise durch Antibiotika verhinderbar

Die in meiner Arbeit verwendeten ATIs wurden aus dem vollen Weizenkorn gewonnen. Um eine mikrobielle Verunreinigung im Rahmen des Herstellungsprozesses auszuschließen, wurde ein Teil der Proben zusätzlich mit dem Antibiotikum Polymyxin B behandelt.

Die Zunahme der oxidativen Burstaktivität – in den Voruntersuchungen bereits signifikant für die hohe ATI-Dosis – wird durch das Hinzugeben von Polymyxin B tendenziell ausgebremst, allerdings ist dieser Unterschied im Vergleich zur ATI-Probe ohne Polymyxin nicht signifikant (Abbildung 13A). Bei den Degranulationsmarkern (CD11b und CD66b) ließen sich keinerlei signifikante Veränderungen feststellen; auch nicht für LPS, das auch in diesem Assay wieder als Positivkontrolle fungierte (Abbildungen 13B und 13F). Für die Phagozytoseaktivität zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Einfluss des Polymyxins auf die ATIs, allerdings ist hier die Phagozytoseaktivität durch LPS nach Beimengung von Polymyxin signifikant verringert (Abbildung 13C). Wie in vorherigen Beobachtungen beschrieben ist auch das L-Selektin-Shedding nicht signifikant durch Kombination von ATIs und Polymyxin verändert, allerdings zeigt auch hier die Positivkontrolle mit LPS erwartungsgemäß ein signifikant geringer ausgeprägtes Shedding (Abbildung 13D). Die Viabilität der PMN wird durch Polymyxin kaum beeinflusst, der Assay zeigt hier keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 13E). Für die IL-8-Sekretion ergeben sich für LPS keine signifikanten Veränderungen, allerdings ist die IL-8 Sekretion der über Nacht aktivierten PMN nach Behandlung mit Polymyxin B und ATIs nicht mehr nachweisbar, für die hohe ATI-Dosis ist die Abnahme der IL-8-Sekretion sogar signifikant (Abbildung 13G).

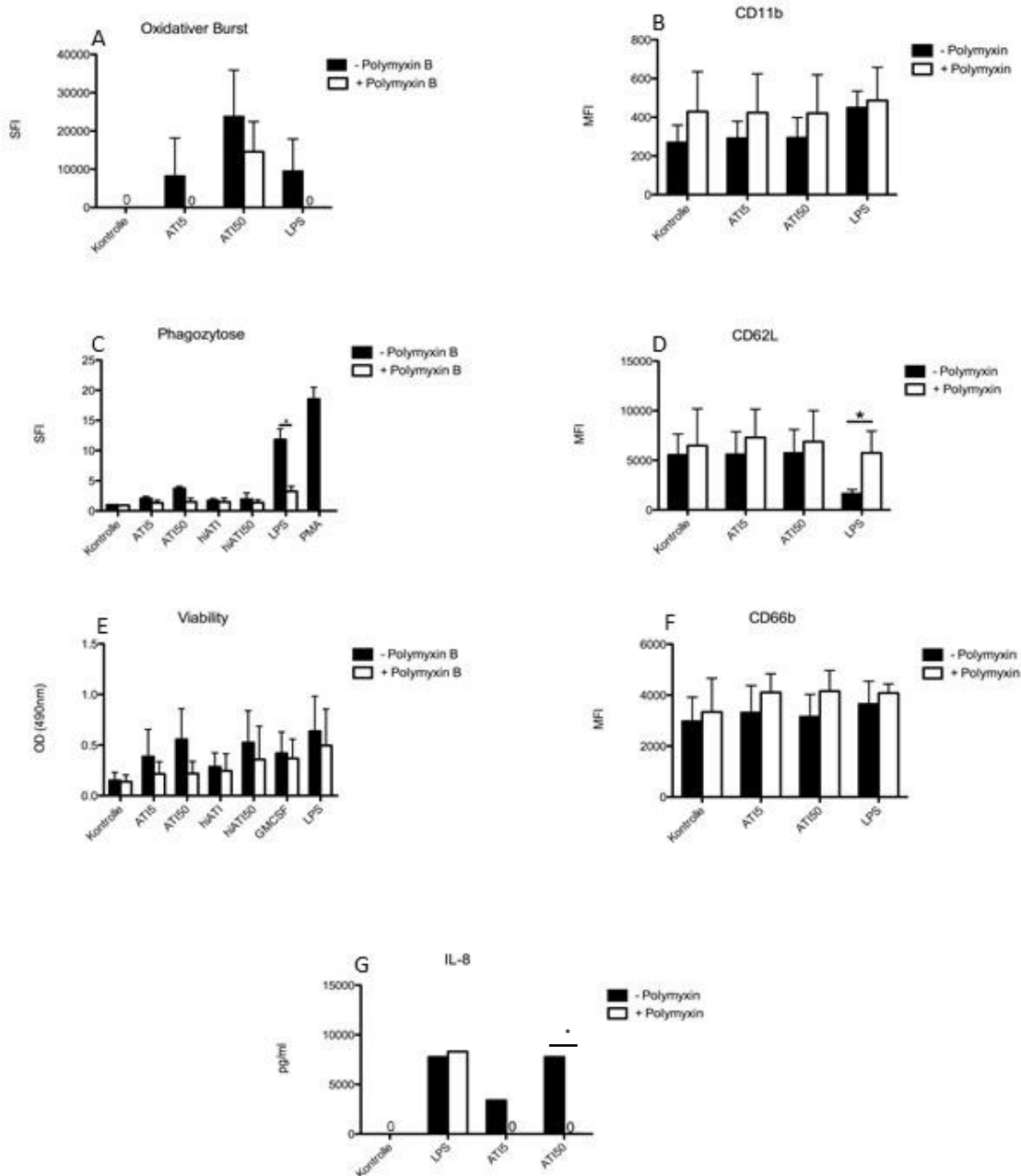


Abbildung 13: Effektorfunktionen von PMN gesunder Spender*innen nach spezifischer Stimulation. PMNs wurden entweder direkt mit dem jeweiligen Agens stimuliert oder zusätzlich mit Polymyxin B vermischt und im Anschluss stimuliert und die jeweilige (Rest-) Aktivität nach antibiotischer Behandlung verglichen. Signifikante Ergebnisse sind mit „*“ gekennzeichnet, 0-Werte sind entsprechend gekennzeichnet. **A** Oxidativer Burst-Assay nach entsprechender Stimulation. Die oxidative Burst-Kinetik wurde mit DCFH-DA mittels Tecan Reader gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 3h Aktivierung. **B** Durchflusszytometrische Untersuchung des Degranulationsverhaltens anhand der CD11b-Expression. **C** Die Phagozytose-Aktivität wurde anhand der Phagozytose PE-gelabelter Beads nach angeführter Stimulation erhoben. **D** Durchflusszytometrische Untersuchung des Sheddings (verminderte CD62L-Expression) nach entsprechender Aktivierung. **E** Die PMN-Viabilität wurde nach über Nacht Aktivierung mittels MTT-Assay erhoben. **F** Durchflusszytometrische Untersuchung des Degranulationsverhaltens anhand der CD66b-Expression. **G** Die IL-8 Sekretion wurde im Überstand von über Nacht aktivierten PMN gemessen.

4.6 ATIs im Western-Blot

Signalkaskaden spielen bei der Vermittlung von Informationen innerhalb von Zellen eine essenzielle Rolle. Um genauer festzustellen über welche Signalwege die Aktivierung von PMN durch ATIs erfolgt, wurde eine Reihe von Signalwegen untersucht. Wie man der Abbildung 14 entnehmen kann, konnte man für Akt und die gesamte p38MAPK keine ATI-abhängigen Unterschiede detektieren (Abbildung 14A, B). Auch die nicht phosphorylierten Formen von SAPK/JNK und p44/42, zeigten in durch ATIs und LPS stimulierten PMN, eine annähernd gleiche Expression (Abbildung 14C, D). Ein Western Blot gegen β -Aktin diente als Kontrolle, bei dem die Bandenstärke aller Proben wie erwartet gleich stark war (Abbildung 14E).

Sieht man sich im Gegensatz dazu die phosphorylierten Formen an, findet man für diese Proteine teilweise unterschiedliche Ergebnisse. Die phosphorylierten Formen der Akt und SAPK/JNK waren kaum nachweisbar. Bei der Betrachtung der phosphorylierten Form von p44/42 ist eine Phosphorylierung sowohl durch ATIs als auch LPS aufgefallen, die bei unstimulierten PMN nicht detektierbar war (Abbildung 14D). Auch wenn die Signaltransduktion nicht endgültig geklärt werden konnte, fanden sich Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung von p44/42 durch ATIs in der Signalkaskade eine Rolle spielen könnte.

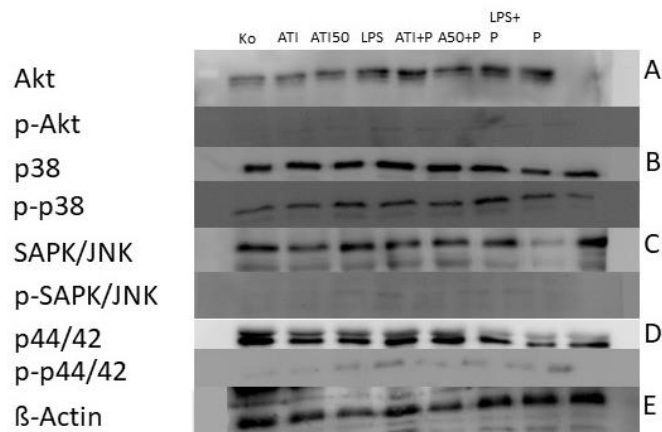


Abbildung 14: PMN wurden nach Isolierung aus dem Vollblut durch LPS und ATI aktiviert und im Anschluss 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Lyse der Proteine mit späterer Darstellung im Western Blot. Gezeigt ist ein repräsentatives, von sechs unabhängigen Experimenten (n=6).

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATIs die Effektorfunktionen [respiratorische Entladung (Burst), Phagozytose, IL-8 Sekretion und Viabilität] neutrophiler Granulozyten gesunder Probanden deutlich beeinflussen und zu einer Aktivierung der Zellen gegenüber den nicht stimulierten Kontrollen führen. Ausdrücklich hervorzuheben ist die Konzentrationsabhängigkeit der ATIs, die höhere Konzentration führte auch zu einer stärkeren Aktivierung der PMN.

Bezüglich der Oberflächenmarkerexpression auf Granulozyten nach Inkubation mit ATIs ist keine statistisch signifikante Zunahme der CD66b- und CD11b-Expression zu vermerken. Ebenso besteht statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen ATIs und dem Shedding von CD62L.

Interessant ist zudem die Beobachtung der Korrelation zwischen LPS und ATIs, die beide eine ähnliche Wirkung hinsichtlich der PMN-Effektorfunktionen entfalten. ATI-bedingte Effektorfunktionen waren in meinen Untersuchungen allerdings nicht komplett durch antibiotisch wirksame Substanzen auslöschar. ATI-bedingte PMN-Aktivierung war teilweise TLR4-unabhängig und durch Hitzebehandlung der ATIs konnten die induzierten Effektorfunktion teilweise verhindert werden.

5 Diskussion

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Daten resultieren aus Untersuchungen von neutrophilen Granulozyten gesunder Probanden. Die Datenlage zur Verwendung neutrophiler Granulozyten gesunder Probanden zur Feststellung des Einflusses von ATIs auf eben diese ist in dieser Form noch nie untersucht worden.

Die neu gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit werden den in der Literatur bereits beschriebenen ähnlichen Untersuchungen in diesem Kapitel gegenübergestellt. Insbesondere werden hier Arbeiten berücksichtigt, die sich mit Zellen, die den neutrophilen Granulozyten in vielerlei Hinsicht ähneln, beschäftigen, den Makrophagen und Monozyten.

5.1 Amylase-Trypsin-Inhibitoren beeinflussen PMN Effektorfunktionen *in vitro*

Die neutrophilen Granulozyten sind in unserem Organismus eine der wichtigsten Zellen des angeborenen Immunsystems, die sich gegen eingedrungene Pathogene richten (82). Ihre Hauptfunktionen sind die Rekrutierung zum Ort des Entzündungsgeschehens, das Erkennen und die Phagozytose von Pathogenen, sowie das Abtöten dieser durch eine Kombination zytotoxischer Mechanismen (82). Um diese Aufgaben erfüllen zu können, bilden PMN reaktive Sauerstoffradikale, setzen antimikrobielle Peptide frei und stoßen ihren Kern- und Zytoplasmahalt aus um NETs zu formieren (82). Im Rahmen dieser Arbeit war eine der Fragestellungen, welche Rolle Amylase-Trypsin-Inhibitoren für die Aktivierung von PMN *in vitro* haben. Hierzu wurden die Effektorfunktionen von neutrophilen Granulozyten unter Zugabe von ATIs, untersucht. Neben ATIs wurden die PMN auch mit LPS als Positivkontrolle sowie mit Medium als Negativkontrollen in allen Experimenten stimuliert. Es konnte in Bezug auf die Effektorfunktionen der PMN folgendes gezeigt werden. Zu den getesteten Konzentrationen von ATIs kann man im Allgemeinen sagen, dass die jeweils induzierte Antwort der Neutrophilen hier stark von der Dosis abhing, diese Erkenntnis ist konkordant mit anderen Studien zu diesem Thema (83). Im oxidativen Burst konnte nachgewiesen werden, dass ATIs – wie auch LPS – eine signifikante Antwort induzierten. Da die ATIs in einem speziellen Verfahren aus dem ganzen Weizenkorn gewonnen wurden, bestand die Möglichkeit einer bakteriellen Verunreinigung

aufgrund des Herstellungsprozesses. Aufgrund dessen erfolgte zusätzlich zur separaten LPS- bzw. ATI-Beimpfung der PMN auch die zusätzliche Beimpfung mit dem Antibiotikum Polymyxin B. Polymyxin B bindet und neutralisiert LPS, somit ist es gut geeignet, um Kontamination durch LPS zu begegnen (84). Durch Zugabe von Polymyxin B konnte eine Reduktion der Burstaktivität beobachtet werden, allerdings war die höhere ATI-Konzentration noch immer in der Lage einen signifikanten Burst zu verursachen. Hieraus kann man schließen, dass ATIs nicht allein aufgrund von bakterieller Kontamination einen oxidativen Burst induzieren. Die Ergebnisse der Phagozytose zeigten hingegen weniger belastbare Daten; die höhere ATI-Konzentration konnte eine signifikante Phagozytoseaktivität induzieren, allerdings wurden diese Effekte durch die Kombination mit Polymyxin vollständig ausgelöscht, sodass man hier mit hoher Wahrscheinlichkeit eine bakterielle Kontamination für den Effekt verantwortlich machen kann. Ob sich das L-Selektin Shedding unter Zugabe von ATIs verändert, wurde bisher noch nicht gezeigt. Deswegen wurde auch dies im Rahmen dieser Arbeit beleuchtet und es zeigte sich, dass ATIs das CD62L-Shedding nicht beeinflussten. Zudem wurde die Degranulation sekundärer Granula in PMN über die Hochregulierung der CD66b und CD11b Oberflächenexpression betrachtet. Auch hier konnte unter Zugabe von ATIs keinerlei signifikante Hochregulierung der CD11b Degranulation nachgewiesen werden. Ebenso wurde keine Beeinflussung von CD66b beobachtet. Dies spricht dafür, dass ATIs diese PMN Effektorfunktionen nicht wesentlich beeinflussen. Des Weiteren brachte ich Neutrophile Granulozyten sowohl mit unveränderten als auch mit hitzebehandelten ATIs in Kontakt. Die Überlegung dahinter war, dass ATIs als Proteine möglicherweise durch Hitze zerstört oder zumindest in ihrer Aktivität gebremst werden könnten. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, dienen ATIs in glutenhaltigem Getreide sowie in anderen Nutzpflanzen der pflanzeneigenen Abwehr vor Krankheiten und Parasiten (24). Die Hitzebehandlung hatte teilweise einen signifikanten oder kaum Einfluss auf die Effektorfunktionen der PMN. Insbesondere der oxidative Burst wurde durch die vorherige Hitzebehandlung der ATIs nahezu vollständig ausgelöscht, auf Phagozytose und IL-8-Sekretion hingegen hatte die Hitzebehandlung keinen signifikanten Einfluss. Andere Arbeiten konnten bereits eine ausgeprägte Hitzeempfindlichkeit von ATIs aufzeigen; so zeigte beispielsweise eine Studie aus dem Jahr 1998, dass Amylase-Inhibitoren aus der Straucherbse nach Hitzebehandlung mit circa 70°C bereits ein Vielfaches ihrer inhibitorischen Aktivität einbüßten (85). Allerdings gibt es auch Belege für

hitzeresistente Amylase-Inhibitoren; so konnte z.B. gezeigt werden, dass Amylase-Inhibitoren der Mungbohne eine ausgeprägte Hitzeresistenz, sogar jenseits der 100°C aufwiesen (86). Anhand dieser Beobachtung lässt sich ableiten, dass die jeweilige Aktivität von ATIs oder verwandten Enzymen abhängig von der jeweiligen Pflanzenart ist und wahrscheinlich sogar von der Art der Zubereitung. Eine mögliche Erklärung für eine fortgesetzte Aktivität von ATIs auch nach dem Backvorgang liefert eine Studie aus dem Jahre 2017 von Zhang et al. (87). Hierbei wurde im Modellversuch die Aktivität von β -Galactosidase nach dem Backen im Brot bestimmt und eine Restaktivität des Enzyms im fertigen Produkt nachgewiesen. Zuvor wurde bereits festgestellt, dass die β -Galactosidase durch Feuchtigkeitsentzug des Mediums an Hitzestabilität gewann. Eine Studie von Zevallos et al. aus dem Jahr 2017 konnte auch für ATIs eine Restaktivität nach dem Backvorgang nachweisen (65). In meiner Arbeit konnte ich zudem in neutrophilen Granulozyten eine vermehrte Freisetzung von IL-8 nach Zugabe von ATIs, wie auch nach LPS Aktivierung der PMN nachweisen, diese Beobachtungen sind konkordant mit den Ergebnissen von Zevallos et al. in o.g. Studie. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die IL-8-Freisetzung direkt mit der ATI-Konzentration zusammenhing; je höher diese war desto mehr IL-8 wurde freigesetzt (65). Dies kann für Patienten eine Ursache für eine verstärkte Immunantwort sein, da hierbei Zytokine und Chemokine eine relevante Rolle spielen. Beispielsweise fördert das IL-8 die Chemotaxis, die Degranulation und die Aktivierung mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen in neutrophilen Granulozyten (88). Um den Einfluss von ATIs auf die Viabilität von PMN näher zu untersuchen, wurde diese mittels MTT-Assays – einem gelben Tetrazolium-Farbstoff – erhoben. MTT-Assays quantifizieren die relative Menge lebender Zellen in einer Probe, hierfür werden die Proben mit dem Farbstoff inkubiert; gesunde Zellen wandeln diesen Farbstoff dann mit Hilfe der Mitochondrien in ein rötliches Endprodukt um; je höher die Anzahl lebender Zellen in der jeweiligen Probe ist, desto ausgeprägter fällt die Rotfärbung aus (89). Für ATIs konnte hier weder in hoher noch niedriger Dosierung eine signifikante Beeinflussung der Viabilität beobachtet werden.

Weitere Studien zu ATIs und deren Beeinflussung von Immunzellen konnten zeigen, dass ATIs potenzielle Auslöser von intestinaler und extraintestinaler Entzündung sein können. Beispielsweise sind ATIs aus Reis als wichtige Allergene bei der Reis-Allergie identifiziert worden (90, 91). Zwischenzeitlich wurde sogar durch Züchtung hypoallergener Reis entwickelt, welcher deutlich ATI-ärmer und vermutlich für Reis-

Allergiker bekömmlicher ist (92, 93). ATIs aus Weizen, Gerste und Roggen sind bei verschiedenen Weizen-assoziierten Unverträglichkeiten involviert (94). Eine Studie zeigte sogar, dass das ATI CM3 aus dem Weizen bei der atopischen Dermatitis eine entscheidende Rolle spielt (95). Rekombinante Proteine der Weizen-ATIs 0.19, 0.28, CM1, CM2 und CM3 lösten IgE-vermittelte Reaktionen bei einem Teil von Mehlstaub-Allergikern (37.5 %) aus (96). In der Kontrollgruppe reagierte keiner der untersuchten Patienten auf diese Proteine. Überdies hatte der ATI CM16 die stärkste allergene Wirkung im Rahmen von Hauttests, bei denen zuvor mittels Prick-Test eine Sensibilisierung auf Weizenmehl beobachtet worden war (97). Jüngste Studien zeigen, dass Weizen ATIs verschiedene entzündlich bedingte Erkrankungen befeuern und dass sie potenzielle Auslöser der NCGS sind (25, 65).

Die Pathophysiologie der NCGS unterliegt schon seit längerer Zeit prüfenden Blicken. In einer Studie von Sapone *et al.* (98) konnte gezeigt werden, dass NCGS-Patienten nicht unter einer verstärkten intestinalen Permeabilität litten wie Zöliakie-Patienten und Claudin-1 und ZO-1, genau wie Zöliakie-Patienten exprimierten. Allerdings fand sich bei den NCGS-Patienten eine deutliche höhere Expression von Claudin-4. Zeitgleich war bei den NCGS-Patienten auch die Expression des Toll-like Rezeptor-2 erhöht sowie ein essentieller Transkriptionsfaktor für regulatorische T-Zellen – FoxP3 – im Vergleich zu Zöliakie-Patienten und der Kontrollgruppe, signifikant vermindert (98). Des Weiteren wurde in den Biopsien von NCGS-Patienten eine vermehrte Anhäufung intraepithelialer Lymphozyten, jedoch keine Hinweise auf Aktivität adaptiver Immunantwort, wie z.B. Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-21 (IL-21) und Interferon- γ (INF- γ) beobachtet (98). Diese Unterschiede der Befunde legten nahe, dass dem angeborenen Immunsystem womöglich eine tragende Rolle bei der Pathophysiologie einer NCGS zukommt. Eine Studie, welche sich mit der Fragestellung beschäftigte, welche Immunantworten kurz nach Gluten-Ingestion bei Zöliakie- oder NCGS-Patienten zu beobachten waren, stellte fest, dass bei Zöliakie sowohl eine adaptive als auch eine angeborene Immunantwort zu beobachten war. NCGS-Patienten zeigten lediglich einen erhöhten IFN- γ -Spiegel sowie eine erhöhte intraepitheliale Expression CD3-positiver T-Zellen. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass auch eine adaptive Immunantwort bei NCGS-Patienten – anders als bei der Studie von Sapone *et al.* – eine Rolle spielen könnte (99). Die Ursachen inflammatorischer Ereignisse in der Mukosa des Dünndarms müssen nicht notwendigerweise von den gleichen Gluten-Peptiden wie bei der Entwicklung einer Zöliakie ausgehen. Dies untermauert eine

Studie von 2013, in welcher die Dünndarm-Mukosa von NCGS-Patienten mit Gliadin inkubiert wurde. Anders als bei einer Zöliakie zeigte die Mukosa keine Entzündungszeichen nach Inkubation mit Gliadin (100). Eine tragende Rolle bei der Immunantwort nach Ingestion von ATIs wird den Toll-like Rezeptoren zugesprochen; hier konnte bereits gezeigt werden, dass ATIs eine TLR4-Aktivierung induzieren (65). Toll-like Rezeptoren sind die am besten untersuchten Muster-Erkennungs-Rezeptoren. Sie spielen eine kritische Rolle bei der angeborenen Immunantwort des Menschen, indem sie pathogen- (PAMPs) oder schaden-assoziierte (DAMPs) Muster erkennen. Bis heute sind zehn humane und 13 murine TLRs bekannt. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 finden sich auf der Zellmembran wohingegen TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 im Inneren der Lysosomen zu finden sind (33). TLR-Aktivierung durch ihre jeweiligen Liganden führt zur Expression proinflammatorischer Zytokine wie Typ I Interferon (IFN) und anderen Chemokinen (42). Bisher werden TLR-Liganden als PAMPs – bestimmte strukturelle Muster von Bakterien, Pilzen oder Viren – oder DAMPs – endogene Proteine, welche bei Gewebsverletzung freigesetzt werden – beschrieben (101). Jedoch wurden bereits andere Gruppen von Molekülen, welche TLR-Signalwege aktivieren, entdeckt; einschließlich, aber nicht begrenzt auf Morphine (102, 103), Glucuronsäure, den Ethanol-Metaboliten Ethyl-Glucuronid (104), das Polyphenol Epigallocatechingallat aus dem grünen Tee (105), Phenethylisothiocyanat (106) und Parthenolid (107). Hinzu kommt, dass höchstwahrscheinlich der gesamte Umfang der TLR-Familie auch zum heutigen Zeitpunkt noch nicht bekannt ist. Im Falle von Zöliakie-Patienten gibt es nur einige wenige funktionale Analysen der TLR-Signalwege. Jedoch wurde gezeigt, dass pathogene Weizenbestandteile ebenso TLR-Signalwege aktivieren können, allerdings ist nicht bekannt, ob sie direkte TLR-Liganden sind (22). Pepsin/Trypsin-behandeltes Gliadin (PT-Gliadin) ist in der Lage LPS-induzierte proinflammatorische Zytokine MyD88-abhängig hochzuregulieren. Ebenso könnte es die TLR2- und TLR4-Genexpression in Makrophagen hochregulieren, allerdings wurde die durch PT-Gliadin ausgelöste Inflammation nicht über TLR2 und TLR4 vermittelt (22). Es wurde gezeigt, dass PT-Gliadin die angeborene Immunantwort von Monozyten *in vitro* stark aktiviert wohingegen sein Effekt auf Dünndarmepithel nur minimal ausfiel. In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass dendritische Zellen von Zöliakie-Patienten mit aktiver und inaktiver Erkrankung ebenso wie eine gesunde Kontrollgruppe auf Gliadin über den TLR4-Signalweg entweder MyD88-abhängig oder unabhängig

reagierten; dieses Phänomen wurde durch die ATI-Familie aus dem Weizen und verwandtem Getreide ausgelöst (25).

Aufgrund ihrer hohen Widerstandskraft gegenüber der intestinalen Proteolyse können ATIs den oberen Gastrointestinaltrakt nahezu unbeschadet passieren. Daher werden sie von Mukosa-ständigen Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und aktivieren den Toll like Rezeptor 4 (TLR4)-MD2-CD14 Komplex von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Dies führt zur Freisetzung proinflammatorischer Chemokine und Zytokine, wie z.B. Interleukin 8, TNF- α und CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) und somit zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems (25, 65, 108). Dieser Auslöser führt zur Migration von Immunzellen nach extraintestinal, z.B. in die mesenterialen Lymphknoten. In den Lymphknoten oder auch den lymphatischen Organen werden T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktionen oder vorbestehende entzündliche Krankheiten, wie z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, systemischer Lupus erythematodes, Autoimmun-Enzephalitis wie auch Atemwegserkrankungen hierdurch intensiviert (108). Weitere *ex vivo* Studien an Dünndarmbiopsien zeigten auf, dass die simultane Exposition des Gewebes mit ATIs und Gluten die T-Zell-spezifische Antwort auf den Gluten-Reiz verstärkte (25). Daher vermutete man, dass ATIs das angeborene Immunsystem stimulieren und auch Symptome der NCGS verstärken. Als Ursache der TLR4-vermittelten Aktivierung von Immunzellen wird die Sekundärstruktur der ATIs vermutet (25). In der Studie von Junker et al. wurde zusätzlich festgestellt, dass die Reduktion von Disulfid-Brücken innerhalb der ATIs zu einem vollständigen Verlust der TLR4-vermittelten Aktivierung führte (25). Der proinflammatorische Effekt der Pepsin-vermittelten Verdauung des Gliadin-Bestandteils im Weizen auf Monozyten wird über MyD88- und TRIF-abhängige TLR-Signalwege über TLR2 und TLR4 vollzogen (109). Im Rahmen eines Screenings auf zufällige Peptid-Verbindungen im Serum von Zöliakie-Patienten sowohl bei aktiver Erkrankung als auch unter Gluten-freier Diät und aktueller Beschwerdefreiheit, wurde ein Peptid identifiziert, welches insbesondere bei aktiver Erkrankung, aber auch bei einer Minderheit von Patienten in Remission durch IgA detektiert wurde; allerdings nicht im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen oder bei Reizdarm-Patienten (110). Das identifizierte Peptid teilte sich die Aminosäure-Sequenz mit zahlreichen humanen Pathogenen, darunter das Rotavirus Serotyp I Glykoprotein VP-7. Die Mehrheit der Patienten mit aktiver Zöliakie wiesen sowohl Antikörper gegen Rotavirus als auch gegen das identifizierte Peptid auf. Das identifizierte Peptid hatte ebenfalls

eine starke Ähnlichkeit mit humanen Proteinen, einschließlich TLR4 (110). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen VP-7 und auch Antikörper gegen das neu identifizierte Peptid den TLR4-Signalweg aktivieren konnten (110). Die vorliegenden Beobachtungen suggerieren einen direkten Einfluss von Gliadin und/oder anderen Bestandteilen des Weizens auf die TLR-Signalwege. Um die Rolle des Gliadins oder anderen Getreidebestandteilen bei der TLR-Aktivierung vollumfänglich anzuerkennen, müsste die echte physische Interaktion von Gliadin oder auch ATIs mit den Toll-like Rezeptoren erwiesen werden. Darüber hinaus sollte erforscht werden, dass die Aktivierung der TLR-Signalkaskade der unmittelbare Downstream-Effekt der ATI/TLR-Ligation ist.

5.2 ATIs aktivieren Neutrophile Granulozyten teilweise TLR4-unabhängig

Im Rahmen meiner Experimente untersuchte ich unter anderem auch die Rolle des Toll-like Rezeptor 4 in Zusammenhang mit ATIs. Über TLR4 wird in Neutrophilen Granulozyten vieles gesteuert und so lag der Verdacht nahe, dass dies auch im Falle von ATIs so sein könnte, insbesondere deshalb, da andere Arbeiten bereits feststellten, dass Zellen des angeborenen Immunsystems wie z.B. Makrophagen mittels TLR4 auf ATIs reagieren (108).

Bei Weizen ATIs handelt es sich um eine Familie von bis zu 17 Proteinen mit einem Molekulargewicht um die 15kDa, einer variablen Primär-, aber stabilen Sekundärstruktur, charakterisiert durch zwei alpha-Helices, verbunden durch fünf Disulfid-Brücken und einer damit einhergehenden sehr hohen Resistenz gegenüber Proteolyse (108). Sie gelten als das Hauptallergen bei der Mehlstaub-Allergie (111). Überdies aktivieren sie den TLR4-MD2-CD14-Komplex und regen somit zu einer verstärkten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine an, und zwar sowohl bei Zöliakie- als auch Nicht-Zöliakie-Patienten sowie in Biopsien von Zöliakie-Patienten (25). Im Rahmen meiner Versuche zeigte sich, dass die Phagozytoseaktivität durch TLR4-Inhibition beeinflusst werden kann. Als Positivkontrolle hierbei diente mir LPS, dass in anderen Arbeiten bereits als Ligand des TLR4-Rezeptors identifiziert wurde (112, 113). Im Versuchsaufbau wurde erwartungsgemäß durch LPS sowohl die Phagozytose als auch der oxidative Burst ausgelöst und durch TLR4-Inhibition ausgelöscht. Bei den ATIs wurde interessanterweise die Phagozytoseaktivität durch TLR4-Inhibition ausgelöscht, die Burstaktivität zeigte sich jedoch nicht vermindert.

Dies lässt vermuten, dass zumindest der oxidative Burst – ausgelöst durch ATIs – über einen anderen Signalweg und nicht über TLR4 vermittelt wird.

Eine weitere Studie untersuchte die Auswirkung von ATIs bei bestehenden Allergien, da bereits Daten vorliegen, dass ATIs bei der Mehlstauballergie eine Rolle spielen (111). Hierfür wurde Probanden, die unter Birken- oder Gräser-Allergien litten, CD4-positive Zellen entnommen, diese wurden dann mit Hilfe von dendritischen Zellen in An- oder Abwesenheit von ATIs stimuliert (114). Im Anschluss wurden diese Zellen auf immundefiziente Mäuse mit dem dazugehörigen Allergen (Birken- oder Gräserpollen) transferiert. Die Mäuse bekamen im Anschluss an diese Intervention drei Wochen lang entweder ATI-freies oder ATI-haltiges Futter verabreicht. Nach drei Wochen erfolgte die intranasale oder rektale Provokation mit dem jeweiligen Allergen (114). Allergen-spezifische T-Zell-Proliferation sowie eine verstärkte Expression inflammatorischer Zytokine war bei den ATI-gefütterten Mäusen signifikant erhöht jedoch nicht bei der Kontrollgruppe (114). Überdies war auch Allergie-spezifisches humanes IgE in den Mäusen unter der ATI-Diät vermehrt feststellbar. IgE-abhängige Kolitis war in der Gruppe der ATI-Mäuse ebenfalls erhöht (114). Interessanterweise wurde die Kolitis Allergen-unabhängig, ausschließlich durch subkutane ATI-Injektion noch weiter verstärkt. Die Injektion von Zeinen zeigte keinen vergleichbaren Effekt. Die anschließende Injektion von humanem TLR4-Antagonist sowie dem Anti-IgE Biological Omalizumab, führte zu einer vollständigen Remission der durch ATIs verursachten Kolitis (114). Dies gibt Hinweise, dass ATIs wichtige, eine Allergie befeuernde, Aktivatoren sein können. Gerade im Hinblick auf die NCGS, die mit verschiedenen diffusen Symptomen einhergeht (46) könnte der Gehalt an ATIs in der Nahrung bestehende Erkrankungen oder Beschwerdebilder verstärken. In meinen Versuchen habe ich eine signifikante, proportionale Zunahme der jeweiligen PMN-Effektorfunktion in Abhängigkeit der ATI-Konzentration beobachten können; besonders deutlich war dieses Phänomen anhand des oxidativen Bursts zu beobachten. War bei Einsatz der geringen ATI-Dosis noch eine sehr milde, aber dennoch signifikante Reaktion zu sehen, so übertraf der Einsatz der höheren Dosis die Wirkung auf die PMNs um ein Vielfaches. Dies konnte auch in einer weiteren Studie festgestellt werden. Diese beschäftigte sich mit einer sehr ähnlichen Fragestellung, hier wurden jedoch die Mäuse direkt sensibilisiert, und zwar durch subkutane Injektion von entweder Ovalbumin oder PBS (83).

Zweck der Untersuchung war hier den Einfluss von ATIs alleinig auf die allergische Atemwegsveränderungen bei Mäusen zu erforschen. Vor Beginn des Experiments wurden alle Mäuse für vier Wochen auf eine Gluten- und ATI-freie Diät (GAFD) gesetzt, dann erfolgte die Einteilung in fünf Gruppen. Gruppe 1 wurde zur Kontrollgruppe und bekam weiterhin die GAFD gefüttert und wurde zusätzlich mit PBS scheinensensibilisiert. Gruppe 2 erhielt die GAFD und wurde mit Ovalbumin sensibilisiert, Gruppe 3 erhielt eine ATI-haltige Diät, in etwa vergleichbar mit den Mengenverhältnissen in der menschlichen Ernährung (G+AD), Gruppe 4 erhielt eine ATI-arme Diät (G-AD) und Gruppe 5 die Höchstdosis ATI (AD), ca. die 1,33-fache Menge wie bei G+AD (83). Nach drei Wochen wurde allen Mäusen mit Hilfe eines Zerstäubers Ovalbumin über die Atmung hinzugeführt, hierzu wurden die Mäuse dreimal hintereinander für 30min innerhalb von 48h dem Allergen ausgesetzt. Danach erfolgte die Anästhesie mit Provokation einer Bronchokonstriktion mit Hilfe eines Parasympathomimetikums, dem Methylcholin. Nach der Tötung der Mäuse wurden Darmschnitte angefertigt sowie eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Zusätzlich wurden Leukozyten aus der Milz gewonnen, um den Grad der Sensibilisierung festzustellen (83). Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Interleukin-8 Produktion proportional zur gefütterten ATI-Menge zunimmt (83). Dieses Phänomen konnte ich wie oben erwähnt auch in meinen Experimenten beobachten, IL-8-Produktion, oxidative Burst- und Phagozytoseaktivität nahmen proportional zur ATI-Konzentration zu. In der Abbildung 15 ist dieser Sachverhalt noch einmal grafisch veranschaulicht; im Vergleich zur Kontrollgruppe sieht man deutlich, dass die GAFD mit der niedrigsten IL-8 Produktion durch milzständige Leukozyten einhergeht.

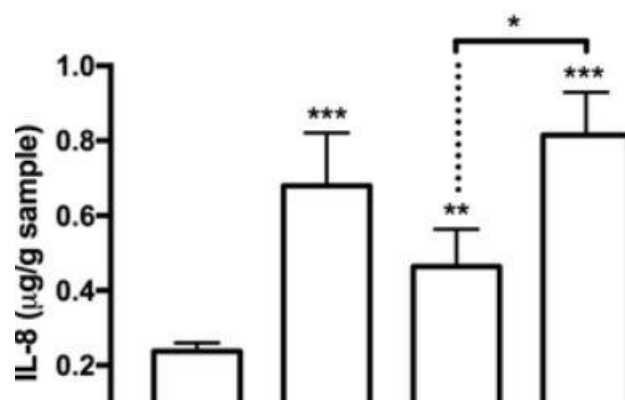


Abbildung 15: IL-8 Expression in Abhängigkeit der ATI-Konzentration im Mäusefutter mittels verschiedener Futterzusammensetzungen, u.a. Gluten- und ATI-freier Kost (GAFD), normaler Kost vergleichbar mit den ATI-Mengen in der menschlichen Ernährung (G+AD), einer ATI-armen Kost (G-AD) sowie einer Kost reich an ATIs (AD) in etwa die 1,4-fache Menge wie in G+AD (84)

5.3 Der Einfluss von Amylase-Trypsin-Inhibitoren auf PMN Signalwege

In neutrophilen Granulozyten haben Vorarbeiten bereits wichtige Regulatoren des Signalweges von TLR4 herausgefunden. Hierzu gehören die PI3K Kinase, sowie die MAP3K Kinasen p38 und p44/42 (78, 115), die nach der Ligation von TLR4 phosphoryliert und somit aktiviert werden. Die TLR4-Aktivierung erfolgt zusammen mit TREM-1 und NOD's (78). Dies führt zu einer synergistischen Aktivierung von Zellen des Immunsystems und zu einer Verstärkung der Immunantwort (78). Eine spezifische Hemmung bestimmter Anteile der Signalkaskaden durch ATIs ist nicht bekannt; um all diese Ergebnisse für neutrophile Granulozyten bestätigen oder ausschließen zu können, wurden PMN mittels LPS und ATIs stimuliert und Western Blot Analysen für p38MAPK, SAPK/JNK, Akt und p44/42 durchgeführt. Für die p38MAPK konnte keinerlei Einfluss der ATIs auf die Phosphorylierung von p38 beobachtet werden, da sowohl die dephosphorylierte als auch die phosphorylierte Form in jeder Probe – in An- oder Abwesenheit von ATIs – repräsentiert war. Ebenso konnte kein Einfluss auf Akt und SAPK/JNK gezeigt werden, hier führte lediglich die Stimulation mittels LPS zu einer Phosphorylierung von Akt. LPS ist bekannt dafür Akt PI3K-abhängig zu phosphorylieren (116) und als Bestandteil von Bakterien ein bekannter Ligand von TLR4-Rezeptoren (112, 113).

Interessanterweise gab es Hinweise auf eine Beteiligung des p44/42-Komplexes, hier konnte die hohe ATI-Dosis – ebenso wie LPS – eine Phosphorylierung von p44/42 bewirken. Studien der letzten Jahrzehnte konnten nachweisen, dass die p44/42 MAPK, auch als ERK 1/2 bezeichnet, vor allem im Hypothalamus exprimiert wird und entscheidenden regulatorischen Einfluss auf das kardiovaskuläre und autonome Nervensystem übt (117, 118). p44/42 ist unter anderem erforderlich für die Aktivierung des Sympathikus im Rahmen einer Hypertonie und spielt zudem eine entscheidende Rolle physiologische und pathologische kardiale Ereignisse zu regulieren (117). Eine Studie aus dem Jahr 2017 hat am Beispiel von Ratten gezeigt, dass eine salzreiche Ernährung zu einem Hypertonus beiträgt, dieser Effekt jedoch durch Hemmung der p44/42 Kinase *in vivo* signifikant gedämpft wird (119). Im Rahmen der Studie wurde den Ratten hierzu über sechs Wochen ein p44/42-Inhibitor infundiert, der PD-98059 (119). Zusätzlich wurde auch die Konzentration von Neurotransmittern im Blut der Ratten untersucht, hier konnte gezeigt werden, dass Ratten, die sich sehr salzreich ernährten und dementsprechend hyperten waren auch signifikant mehr Glutamat und

weniger GABA im Blut aufwiesen als jene Ratten, die zusätzlich zur Salzdiät die Infusionsbehandlung mit PD-98059 genossen hatten (119). Diese Erkenntnisse sind insbesondere für meine Arbeit von großem Interesse, da sie die Phänomene bei NCGS-Patienten näher beleuchten könnten. Die typischen Symptome der NCGS sind nicht konkret greifbar und am Ehesten als „allgemeine Krankheitssymptome“ zu bewerten. Vordergründig klagten NCGS-Patienten über Stuhlunregelmäßigkeiten, Meteorismus und Bauchschmerzen, allerdings gaben viele auch Symptome einer Depression an (48). In Anbetracht der Erkenntnisse aus der Ratten-Studie von 2017 sollten uns diese weiter zum Nachdenken anregen und mit in die Entwicklung potenzieller Medikamente einfließen.

5.4 Mögliches Management ATI-induzierter gastrointestinaler Beschwerden

Die Hypothese, dass ATIs über TLR-Signalwege proinflammatorische Wege initiieren, könnte durch weitergehende Experimente gefestigt werden. Betrachtet man Studien zu den Einflüssen von ATIs auf den menschlichen Körper zusammenfassend, so sieht man insbesondere Parallelen zu Autoimmunerkrankungen und Allergien. Wie in 5.3 genannt, konnten bereits Studien mit Mäusen Erfolge bei der Behandlung einer ATI-induzierten Colitis mit Hilfe des Anti-IgE Biologicals Omalizumab verbucht werden (114). Omalizumab ist in Deutschland bereits für den Menschen zugelassen und wird bei schwerem, therapieresistenten Asthma bronchiale und chronischer spontaner Urtikaria bereits eingesetzt (120). Bei insgesamt guter Verträglichkeit (120) wäre die Erweiterung der Zulassung für besonders stark ausgeprägte NCGS-Beschwerden denkbar; zuvor müssten allerdings noch weitere Studien über die Wirksamkeit angeschlossen werden. Weitere Therapieansätze insbesondere mit Hinblick auf die Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Krebs konzentrieren sich auf die Entwicklung zielgerichteter Therapeutika gegen Toll-like Rezeptoren. Infektionen, Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und Krebs beinhalten allesamt sehr komplexe Signalkaskaden, die viele potenzielle Angriffspunkte für Therapeutika liefern. Trotz dieser Komplexität wurde bereits gezeigt, dass die Hemmung eines einzelnen Proteins wie dem TNF- α eine immense therapeutische Wirkung entfalten kann (121). In Anlehnung an meine Arbeit sind hier vor allem mögliche Bindungspartner des Toll-like Rezeptors 4 oder seiner Bestandteile von Bedeutung. Ein bekannter TLR4-Ligand ist beispielsweise das Monophosphoryl

Lipid A (MPL), das als synthetisches Adjuvans mancher Impfstoffe eingesetzt wird (122). In einem kürzlich entwickelten Impfstoff zur Hyposensibilisierung von Pollenallergikern wurde ein Extrakt aus Ambrosien-Pollen mit MPL verbunden, die anschließende parenterale Verabreichung an Ratten führte über TLR4 zu einer Aktivierung der Signalkaskade und die allergischen Symptome waren im Vergleich zu Placebo signifikant reduziert (122). Ein ähnliches Vorgehen wäre auch für die Behandlung mittels ATIs oder anderer Bestandteile des Korns denkbar, es müsste nur ein probabler Weg gefunden werden ATIs oder zumindest Bestandteile von ihnen mit MPL zu verbinden und eine ähnliche Wirkung zu erzielen.

Ein alternativer Weg wäre die Inhibition von TLR4 wie es auch im Rahmen meiner Experimente mittels CLI-095 erfolgte. Lipid-A ist die biologisch aktive Form des bakteriellen LPS-Moleküls (123). Die Bindung von LPS an den TLR4-Rezeptor induziert die Formation des TLR4-MD-2-LPS Multimers (123). Fünf der sechs Lipid-Ketten von Lipid-A sind in einer hydrophoben Tasche von MD-2 verborgen, die sechste freiliegende Kette interagiert mit den Phenylalaninen des TLR4-Rezeptors (123). Seit die genaue Struktur des TLR4-MD2-Komplexes bekannt ist, hat die Entwicklung von TLR4-Antagonisten einen gewaltigen Sprung nach vorne gemacht (123). Ein bekannter TLR4-Antagonist ist das synthetische Lipodisaccharid Eritoran (E5564) welches im Tiermodell bereits zeigen konnte, dass es die Auswirkungen von LPS-Inhalation und Sepsis reduzieren konnte (124, 125). Ursächlich für die Inhibition von TLR4 durch Eritoran ist nach aktuellen Erkenntnissen vermutlich die fehlende Möglichkeit des MD-2 unter Eritoran die F126-Position zu verändern, welche sonst bei Stimulation mit LPS vollzogen wird (123). Solche molekularen Details könnten für die Entwicklung zusätzlicher TLR4-Antagonisten sehr nützlich sein.

Darüber hinaus verringert Eritoran die Produktion proinflammatorischer Zytokine in durch LPS stimulierten menschlichen Monozyten (126). In einer klinischen Phase II-Studie reduzierte Eritoran die Mortalität in Folge einer Sepsis nach Bypass-Operation um 6,4% im Vergleich zur Placebo-Gruppe (127). Diese Beobachtungen führten zu der Initiierung einer weiteren Tierstudie, hier wurde festgestellt, dass Eritoran parenteral entweder als kontinuierliche Infusion oder als wiederholte intravenöse Applikation verabreicht werden musste, um den Spiegel aufrecht zu erhalten, der für die Erzielung eines therapeutischen Effekts erforderlich war (128). Ob und inwieweit diese Beobachtungen und Experimente einen Einfluss auf die Behandlung ATI-induzierter Beschwerden haben, müssen weiterführende Studien zeigen.

Falls ATIs tatsächlich als Pathogene im Rahmen einer Zöliakie oder auch einer NCGS fungieren und TLR-Signalwege aktivieren, wäre die gezielte Therapie gegen den jeweiligen Toll-like Rezeptor als neue, therapeutische Möglichkeit bei der Zöliakie denkbar.

Alternativ wäre auch die biochemische Veränderung der ATIs im Getreide denkbar, sodass diese mit den TLRs nicht mehr interagieren können. Genetisch veränderter Weizen oder andere ursächliche Getreide könnten dann an Zöliakie-Patienten angepasst und in großem Maße produziert werden. Die Entwicklung von hypoallergenem Reis durch Züchtung und einer signifikanten Reduzierung des ATI-Anteils hat bereits Hinweise auf eine bessere Verträglichkeit geliefert (92).

5.5 Resümee

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen einen Einfluss von Amylase-Trypsin-Inhibitoren auf die Effektorfunktionen Neutrophiler Granulozyten. Insbesondere der oxidative Burst werden durch ATIs maßgeblich beeinflusst, zudem zeigt sich eine Beeinflussung des TLR4-Signalweges, wie es auch zahlreiche andere Arbeiten für verwandte Blutzellen nachweisen konnten, der spezifische Einfluss von ATIs auf PMN wurde bisher noch nicht untersucht.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ATIs auf die Expression granulozytärer Oberflächenmarker wie CD66b, CD11b und CD62L keinen Einfluss nehmen. Diese Dissertation strebt nach der näheren Untersuchung und Beleuchtung von ATIs und deren Einfluss auf Prozesse im menschlichen Organismus. Eine validierte Abwägung und Bewertung der gemachten Beobachtungen bei offen gebliebenen Fragen, wie z.B. dem genauen Wirkmechanismus der ATIs muss nach Erhebung weiterer, vor allem klinischer Daten geschehen.

6 Zusammenfassung

Amylase-Trypsin-Inhibitoren gehören zu den natürlichen Bestandteilen von Getreidesorten, ihre Aufgabe besteht vornehmlich in der Abwehr von Fraßfeinden. Jahrzehnte der Züchtung haben im Interesse der Erzeuger zu einem prozentualen Anstieg von ATIs im vollen Korn geführt (24).

Verschiedene Arbeiten haben bereits gezeigt, dass ATIs das angeborene Immunsystem aktivieren, dies wurde insbesondere schon für Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen nachgewiesen (108). Die zentrale Frage meiner Arbeit bestand darin, ob diese Beobachtungen auch auf eine weitere Gruppe von Blutkörperchen zutreffen; den Neutrophilen Granulozyten.

In meiner Arbeit konnte ich nachweisen, dass ATIs gewisse Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten signifikant beeinflussen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass sich das Ausmaß der Aktivität von Effektorfunktionen, in diesem Fall dem oxidativen Burst, der Phagozytose, der IL-8 Sekretion und der Viabilität proportional zur ATI-Konzentration verhält. Unklar blieb über welchen genauen Mechanismus die ATIs die PMNs beeinflussen. Die Signalvermittlung über den TLR4-Rezeptor scheint hierbei nur teilweise eine Rolle zu spielen. Außerdem fanden sich Hinweise für eine mikrobielle Kontamination. Beides erklärt jedoch nicht alle beobachteten Effekte, sodass insgesamt ein differentielles PMN-Aktivierungsprofil besteht. Ob und inwieweit die Ergebnisse der Experimente klinische Relevanz haben, müssen weitergehende Studien untersuchen. Zusammenfassend kann man sagen, dass ATIs in jedem Fall zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen. Zudem könnte ihr Einfluss sich allein über die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren bemerkbar machen, möglich ist auch, dass der genaue Aktivierungsweg zum Zeitpunkt aktueller Forschungen über uns unbekannte Wege erfolgt.

7 Literaturverzeichnis

1. Bild: <http://www.dermnet.com/Dermatitis-Herpetiformis/picture/13624>
2. Gesellschaft DZ. Dünndarmbiopsie und Histologie nach Marsh. [Available from: <https://www.dzg-online.de/marsh-kriterien.387.0.html>]
3. Altenbach SB, Vensel WH, Dupont FM. The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86. *BMC Research Notes*. 2011 2011/07/20;4(1):242.
4. Dupont FM, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Altenbach SB. Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry. *Proteome Science*. 2011 2011/02/11;9(1):10.
5. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci*. 2018;27(1):135-45.
6. Charmet G. Wheat domestication: Lessons for the future. *Comptes Rendus Biologies*. 2011 2011/03/01;334(3):212-20.
7. Shewry PR, Halford NG, Lafiandra D. Genetics of Wheat Gluten Proteins. In: Hall JC, Dunlap JC, Friedmann T, eds. *Advances in Genetics, Volume 49, 2003, Pages 111-184*
8. Rej A, Aziz, I., & Sanders, D. (n.d.). *Breaking Bread! Proceedings of the Nutrition Society*. 2018.
9. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*. 2007 2007/04/01;24(2):115-9.
10. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*. 1997 07/01/online;3:797.
11. van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Peña S, Mearin L, Papadopoulos G, et al. Cutting Edge: Selective Deamidation by Tissue Transglutaminase Strongly Enhances Gliadin-Specific T Cell Reactivity. *The Journal of Immunology*. 1998;161(4):1585.
12. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *The Lancet*. 2009;373(9673):1480-93.
13. Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Gastroenterology*. 2009;137(6):1912-33.
14. Molberg Ø, McAdam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nature Medicine*. 1998 06/01/online;4:713.
15. Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, et al. Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. *Science*. 2002;297(5590):2275.
16. Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AVS. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nature Medicine*. 2000 03/01/online;6:337.
17. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007 10/17/online;449:819.
18. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *The Lancet*. 2003;362(9377):30-7.
19. Hüe S, Mention J-J, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, et al. A Direct Role for NKG2D/MICA Interaction in Villous Atrophy during Celiac Disease. *Immunity*. 2004;21(3):367-77.
20. Nikulina M, Habich C, Flohé SB, Scott FW, Kolb H. Wheat Gluten Causes Dendritic Cell Maturation and Chemokine Secretion. *The Journal of Immunology*. 2004;173(3):1925.
21. Cinova J, Palová-Jelínková L, Smythies LE, Černá M, Pecharová B, Dvořák M, et al. Gliadin Peptides Activate Blood Monocytes from Patients with Celiac Disease. *Journal of Clinical Immunology*. 2007 2007/03/01;27(2):201-9.

22. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin Stimulation of Murine Macrophage Inflammatory Gene Expression and Intestinal Permeability Are MyD88-Dependent: Role of the Innate Immune Response in Celiac Disease. *The Journal of Immunology*. 2006;176(4):2512.
23. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, et al. Gliadin Induces an Increase in Intestinal Permeability and Zonulin Release by Binding to the Chemokine Receptor CXCR3. *Gastroenterology*. 2008;135(1):194-204.e3.
24. Schuster N. Wenn Brot Beschwerden macht; 2013 19/11/2013.
25. Junker Y, Zeissig S, Kim S-J, Barisani D, Wieser H, Leffler DA, et al. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(13):2395.
26. Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V. The Role of Neutrophils and Monocytes in Innate Immunity. *Contributions to Microbiology*. 2008;15:118-46.
27. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS pathogens*. 2015;11(3):e1004651-e.
28. Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil Priming: Pathophysiological Consequences and Underlying Mechanisms. *Clinical Science*. 1998;94(5):461.
29. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(7):1283-99.
30. Babior. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE, *American Journal of Medicine*, Volume 280, Issue 5, May 2001, pages E685-E694
31. Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *The Journal of Cell Biology*. 1983;97(1):52.
32. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews*. 2007 2007/10/01;219(1):88-102.
33. Rassow, JH; Hauser, Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer, *Duale Reihe Biochemie*, 3. Auflage, 2012, Seiten 230-256
34. Sengeløv H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C, Borregaard N. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *The Journal of Immunology*. 1995;154(8):4157.
35. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532.
36. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*. 2005 2006/04/01;8(4):668-76.
37. McDonald B, Urrutia R, Yipp Bryan G, Jenne Craig N, Kubes P. Intravascular Neutrophil Extracellular Traps Capture Bacteria from the Bloodstream during Sepsis. *Cell Host & Microbe*. 2012 2012/09/13;12(3):324-33.
38. G Yipp B, Petri B, Salina D, Jenne C, N V Scott B, Zbytnuik L, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo, *Nature Medicine*, Volume 18, 2012 Pages 1386-1393
39. Juárez-Ortega M, Rojas-Espinosa O, Muñoz-Salazar R, Becerril-Villanueva E, Hernández-Solís A, Arce-Paredes P, et al. Sera from patients with active pulmonary tuberculosis and their household contacts induce nuclear changes in neutrophils. *Infection and drug resistance*. 2018;11:1685-702.
40. Lowe DM, Bandara AK, Packe GE, Barker RD, Wilkinson RJ, Griffiths CJ, et al. Neutrophilia independently predicts death in tuberculosis. *The European respiratory journal*. 2013;42(6):1752-7.
41. Zhang X, Majlessi L, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R. Coactivation of Syk Kinase and MyD88 Adaptor Protein Pathways by Bacteria Promotes Regulatory Properties of Neutrophils. *Immunity*. 2009 2009/11/20;31(5):761-71.

42. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2004 07/01/online;4:499.
43. Aktualisierte S2k-Leitlinie Zöliakie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) , Update Dezember 2021, Seiten 103-104
44. Rubio-Tapia A. ACG Clinical Guidelines: Diagnosis and Management of Celiac Disease, *Journal of Gastroenterology*, May 2013, Volume 108, Issue 5, pages 656-676
45. Gesellschaft DZ. Abgrenzung der Zöliakie zum Krankheitsbild der „Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität“. [cited 2018 14.12.2018]; Available from: <https://www.dzg-online.de/krankheitsbild.312.0.html>
46. Biesiekierski J, Newnham E, Irving P, Barrett J, Haines M, Doecke J, et al. Gluten Causes Gastrointestinal Symptoms in Subjects Without Celiac Disease: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial, *American Journal of Gastroenterology*, March 2011, Volume 106, Issue 3, pages 508-514
47. Carroccio A, Mansueto P, Iacono G, Soresi M, D'Alcamo A, Cavataio F, et al. Non-Celiac Wheat Sensitivity Diagnosed by Double-Blind Placebo-Controlled Challenge: Exploring a New Clinical Entity. *The American Journal Of Gastroenterology*. 2012 07/24/online;107:1898.
48. Peters SL, Biesiekierski JR, Yelland GW, Muir JG, Gibson PR. Randomised clinical trial: gluten may cause depression in subjects with non-coeliac gluten sensitivity – an exploratory clinical study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2014 2014/05/01;39(10):1104-12.
49. Van Wijk CH. The use of Spielberger's State-Trait Personality Inventory (trait anxiety subscale) with naval subaquatic specialists. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 2014 2014/12/01;27(6):959-66.
50. Carbonero P, García-Olmedo F. A Multigene Family of Trypsin/ α -Amylase Inhibitors from Cereals. In: Shewry PR, Casey R, eds. *Seed Proteins*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999:617-33.
51. Silano V, Pocchiari F, Kasarda DD. Physical characterization of α -amylase inhibitors from wheat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 1973 1973/07/12;317(1):139-48.
52. Zoccatelli G, Segal M, Bolla M, Cecconi D, Vaccino P, Rizzi C, et al. Expression of α -amylase inhibitors in diploid *Triticum* species. *Food Chemistry*. 2012 2012/12/15;135(4):2643-9.
53. Priya S, Kumar S, Kaur N, Gupta AK. Specificity of α -amylase and trypsin inhibitor proteins in wheat against insect pests. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 2013 2013/03/01;41(1):49-56.
54. Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Ali I, Bonfili L, Cecarini V, Eleuteri AM, et al. Interaction between wheat alpha-amylase/trypsin bi-functional inhibitor and mammalian digestive enzymes: Kinetic, equilibrium and structural characterization of binding. *Food Chemistry*. 2016 2016/12/15;213:571-8.
55. Buonocore V, Petrucci T, Silano V. Wheat protein inhibitors of α -amylase. *Phytochemistry*. 1977 1977/01/01;16(7):811-20.
56. Shewry Peter R. DLt, Gabriel Salcedo+, Cipriano Aragoncillo+, Francisco Garcia-Olmedo+ EJ-LL, Mary D. Dietler* and Donald D. Kasarda* N-terminal amino acid sequences of chloroform/methanol-soluble proteins and albumins from endosperms of wheat, barley and related species *FEBS*. 1984;175(2):359-63.
57. Juhász A, Belova T, Florides CG, Maulis C, Fischer I, Gell G, et al. Genome mapping of seed-borne allergens and immunoresponsive proteins in wheat. *Science Advances*. 2018;4(8):eaar8602.
58. Paoerio E, Caporale C, Carrano L, Caruso C, Vacca F, Buonocore V. The amino acid sequence and reactive site of a single-headed trypsin inhibitor from wheat endosperm. *Journal of Protein Chemistry*. 1994 1994/02/01;13(2):187-94.
59. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D158-D69.
60. Paoerio EC, Carlo; Carrano, Lucia; Pucci, Piero and Buonocore, Vincenzo. Assignment of the five disulfide bridges in an α -amylase inhibitor from wheat kernel

- by fast-atom-bombardment mass spectrometry and Edman degradation. *Eur J Biochem.* 1991;199:595-600.
61. Maeda K, Wakabayashi S, Matsubara H. Disulfide Bridges in an α -Amylase Inhibitor from Wheat Kernel. *The Journal of Biochemistry.* 1983;94(3):865-70.
 62. Oda Y, Matsunaga T, Fukuyama K, Miyazaki T, Morimoto T. Tertiary and Quaternary Structures of 0.19 α -Amylase Inhibitor from Wheat Kernel Determined by X-ray Analysis at 2.06 Å Resolution. *Biochemistry.* 1997 1997/11/01;36(44):13503-11.
 63. Warchalewski JR. Purification and characteristics of an endogenous alpha-amylase and trypsin inhibitor from wheat seeds. *Die Nahrung.* 1987;31(10):1015-31.
 64. Dupont FM, Altenbach SB. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science.* 2003 2003/09/01;38(2):133-46.
 65. Zevallos VF, Raker V, Tenzer S, Jimenez-Calvente C, Ashfaq-Khan M, Rüssel N, et al. Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. *Gastroenterology.* 2017;152(5):1100-13.e12.
 66. Silano V, Furia M, Gianfreda L, Macri A, Palescandolo R, Rab A, et al. Inhibition of amylases from different origins by albumins from the wheat kernel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology.* 1975 1975/05/23;391(1):170-8.
 67. Gatehouse AMRF, K. A.; Jepson, I.; Pavey, D. J. The effects of α -amylase inhibitors on insect storage pests: Inhibition of α -amylase in vitro and effects on development in vivo. *Sci Food Agric.* 1986(37):727-34.
 68. O'Donnell MD, McGeeney KF. Purification and properties of an α -amylase inhibitor from wheat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology.* 1976 1976/01/23;422(1):159-69.
 69. Smith C, van Megen W, Twaalfhoven L, Hitchcock C. The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 1980 1980/04/01;31(4):341-50.
 70. Page D, Quillien L, Duc G. Trypsin inhibitory activity measurement: Simplifications of the standard procedure used for pea seed. *Crop Science.* 2000 2000/09/01;40(5):1482-5.
 71. Wieser HS, Katharina. Preparation of a Defined Gluten Hydrolysate for Diagnosis and Clinical Investigations of Wheat Hypersensitivities. *Nutrients.* 2018;10(10):1411.
 72. Prandi B, Faccini A, Tedeschi T, Galaverna G, Sforza S. LC/MS analysis of proteolytic peptides in wheat extracts for determining the content of the allergen amylase/trypsin inhibitor CM3: Influence of growing area and variety. *Food Chemistry.* 2013 2013/09/01;140(1):141-6.
 73. Capocchi A, Muccilli V, Cunsolo V, Saletti R, Foti S, Fontanini D. A heterotetrameric alpha-amylase inhibitor from emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) seeds. *Phytochemistry.* 2013 2013/04/01;88:6-14.
 74. He F. Bradford Protein Assay. *Bio-protocol.* 2011 2011/03/20;1(6):e45.
 75. Penin F, Godinot C, Gautheron DC. Two Dimensional Anionic-Cationic Detergents Polyacrylamide Gel Electrophoresis: a New Strategy in the Separation of Membrane Proteins. In: Peeters H, ed. *Protides of the Biological Fluids: Elsevier, 1985:1017-20.*
 76. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: Walker JM, ed. *Proteins. Totowa, NJ: Humana Press, 1984:41-55.*
 77. Quantity One® User Guide for Version 4.5 Windows and Macintosh, 2003 by Bio-Rad Laboratories, Pages C2-C14
 78. Prüfer S. Zelluläre und molekulare Mechanismen der angeborenen Immunität. *JGU Mainz, 2013:44-6.*
 79. Fulwyler MJ. Electronic Separation of Biological Cells by Volume. *Science.* 1965;150(3698):910.
 80. Valet G. Past and present concepts in flow cytometry: A European perspective, *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, Volume 17, Issue 3, July-September 2003, Pages 213-222*
 81. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971 1971/09/01;8(9):871-4.

82. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181-218.
83. Zevallos VF, Raker VK, Maxeiner J, Scholtes P, Steinbrink K, Schuppan D. Dietary wheat amylase trypsin inhibitors exacerbate murine allergic airway inflammation. *European Journal of Nutrition.* 2018 2018/03/29.
84. Cardoso LS, Araujo MI, Góes AM, Pacífico LG, Oliveira RR, Oliveira SC. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fact.* 2007;6:1-.
85. Giri AP, Kachole MS. Amylase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus cajan*) seeds. *Phytochemistry.* 1998 1998/01/01/;47(2):197-202.
86. Soghra K, Haq S, Shaikh M, Atif R, Khan RH. Biochemical characterization, stability studies and N-terminal sequence of a bi-functional inhibitor from *Phaseolus aureus* Roxb. (Mung bean). 2005 01/01.
87. Zhang L, Chen XD, Boom RM, Schutyser MAI. Thermal inactivation kinetics of β -galactosidase during bread baking. *Food Chemistry.* 2017 2017/06/15/;225:107-13.
88. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine, *FEBS letters*, Volume 307, Issue 1, July 1992, Pages 97-101
89. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability, *Drug Design and Discovery*, Volume 1, Pages 157-168
90. Izumi H, Adachi T Fau - Fujii N, Fujii N Fau - Matsuda T, Matsuda T Fau - Nakamura R, Nakamura R Fau - Tanaka K, Tanaka K Fau - Urisu A, et al. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a major allergenic protein in rice seeds. Homology of the deduced amino acid sequence with members of alpha-amylase/trypsin inhibitor family, *FEBS letters*, Volume 302, Issue 3, May 1992, Pages 213-216
91. Alvarez AM, Adachi T Fau - Nakase M, Nakase M Fau - Aoki N, Aoki N Fau - Nakamura R, Nakamura R Fau - Matsuda T, Matsuda T. Classification of rice allergenic protein cDNAs belonging to the alpha-amylase/trypsin inhibitor gene family, *BBA - Protein Structure and Molecular Enzymology*, Volume 1251, Issue 2, September 1995, Pages 201-204
92. Tada Y, Nakase M, Adachi T, Nakamura R, Shimada H, Takahashi M, et al. Reduction of 14–16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense gene. *FEBS Letters.* 1996 1996/08/12/;391(3):341-5.
93. Watanabe M. Hypoallergenic rice as a physiologically functional food. *Trends in Food Science & Technology.* 1993 1993/05/01/;4(5):125-8.
94. Kucek LK, Veenstra LD, Amnuaycheewa P, Sorrells ME. A Grounded Guide to Gluten: How Modern Genotypes and Processing Impact Wheat Sensitivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2015 2015/05/01/;14(3):285-302.
95. Kusaba-Nakayama M, Ki M Fau - Iwamoto M, Iwamoto M Fau - Shibata R, Shibata R Fau - Sato M, Sato M Fau - Imaizumi K, Imaizumi K. CM3, one of the wheat alpha-amylase inhibitor subunits, and binding of IgE in sera from Japanese with atopic dermatitis related to wheat, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 38, Issues 2-3, February 2000, Pages 179-185
96. Sander I, Rozynek P, Rihs HP, van Kampen V, Chew FT, Lee WS, et al. Multiple wheat flour allergens and cross-reactive carbohydrate determinants bind IgE in baker's asthma. *Allergy.* 2011 2011/09//;66(9):1208-15.
97. Armentia A, Sanchez-Monge R, Gomez L, Barber D, Salcedo G. In vivo allergenic activities of eleven purified members of a major allergen family from wheat and barley flour. *Clinical & Experimental Allergy.* 1993 1993/05/01/;23(5):410-5.
98. Sapone A, Lammers KM, Mazzarella G, Mikhailenko I, Cartenì M, Casolaro V, et al. Differential mucosal IL-17 expression in two gliadin-induced disorders: gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy celiac disease. *International archives of allergy and immunology.* 2010;152(1):75-80.
99. Brottveit M, Beitnes A-CR, Tollefsen S, Bratlie JE, Jahnsen FL, Johansen F-E, et al. Mucosal Cytokine Response After Short-Term Gluten Challenge in Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity. *The American Journal Of Gastroenterology.* 2013 04/16/online;108:842.

100. Bucci C, Zingone F, Russo I, Morra I, Tortora R, Pogna N, et al. Gliadin Does Not Induce Mucosal Inflammation or Basophil Activation in Patients With Nonceliac Gluten Sensitivity. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2013;11(10):1294-9.e1.
101. Ito T. PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *Journal of Intensive Care*. 2014 2014/12/31;2(1):65.
102. Wang X, Loram LC, Ramos K, de Jesus AJ, Thomas J, Cheng K, et al. Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(16):6325.
103. Fukagawa H, Koyama T, Kakuyama M, Fukuda K. Microglial activation involved in morphine tolerance is not mediated by toll-like receptor 4. *Journal of Anesthesia*. 2013 2013/02/01;27(1):93-7.
104. Lewis SS, Hutchinson MR, Zhang Y, Hund DK, Maier SF, Rice KC, et al. Glucuronic acid and the ethanol metabolite ethyl-glucuronide cause toll-like receptor 4 activation and enhanced pain. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2013 2013/05/01/;30:24-32.
105. Byun E-B, Choi H-G, Sung N-Y, Byun E-H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits TLR4 signaling through the 67-kDa laminin receptor on lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012 2012/10/05/;426(4):480-5.
106. Park H-J, Kim S-J, Park S-J, Eom S-H, Gu G-J, Kim SH, et al. Phenethyl isothiocyanate regulates inflammation through suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of Toll-like receptors. *Life Sciences*. 2013 2013/04/19/;92(13):793-8.
107. Park S-J, Shin H-J, Youn H-S. Parthenolide inhibits TRIF-dependent signaling pathway of toll-like receptors in RAW264.7 macrophages. *Molecules and Cells*. 2011 2011/03/01/;31(3):261-5.
108. Schuppan D, Zavallos V. Wheat Amylase Trypsin Inhibitors as Nutritional Activators of Innate Immunity. *Digestive Diseases*. 2015;33(2):260-3.
109. Palová-Jelínková L, Dáňová K, Drašarová H, Dvořák M, Funda DP, Fundová P, et al. Pepsin Digest of Wheat Gliadin Fraction Increases Production of IL-1 β via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- κ B Signaling Pathway and an NLRP3 Inflammasome Activation. *PLOS ONE*. 2013;8(4):e62426.
110. Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, et al. In Celiac Disease, a Subset of Autoantibodies against Transglutaminase Binds Toll-Like Receptor 4 and Induces Activation of Monocytes. *PLOS Medicine*. 2006;3(9):e358.
111. Catassi C, Bai JC, Bonaz B, Bouma G, Calabrò A, Carroccio A, et al. Non-Celiac Gluten sensitivity: the new frontier of gluten related disorders. *Nutrients*. 2013;5(10):3839-53.
112. Park BS, Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*. 2013 2013/12/01/;45(12):e66-e.
113. Gomes NE, Brunialti MKC, Mendes ME, Freudenberg M, Galanos C, Salomão R. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2010;43:853-8.
114. Bellinghausen I, Weigmann B, Zavallos V, Maxeiner J, Reißig S, Waisman A, et al. Wheat amylase-trypsin inhibitors exacerbate intestinal and airway allergic immune responses in humanized mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018 2018/03/21/.
115. Haselmayer P, Grosse-Hovest L, von Landenberg P, Schild H, Radsak MP. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood*. 2007;110(3):1029.
116. Schabbauer G, Luyendyk J Fau - Crozat K, Crozat K Fau - Jiang Z, Jiang Z Fau - Mackman N, Mackman N Fau - Bahram S, Bahram S Fau - Georgel P, et al. TLR4/CD14-mediated PI3K activation is an essential component of interferon-dependent VSV resistance in macrophages, *Molecular Immunology*, Volume 45, Issue 10, May 2008, Pages 2790-2796
117. Wei S-G, Yu Y, Zhang Z-H, Weiss RM, Felder RB. Angiotensin II-Triggered p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase Mediates Sympathetic Excitation in Heart Failure Rats. *Hypertension*. 2008; 52(2):342-50.

118. Yu Y, Wei S-G, Zhang Z-H, Weiss RM, Felder RB. ERK1/2 MAPK signaling in hypothalamic paraventricular nucleus contributes to sympathetic excitation in rats with heart failure after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(6):H732-H9.
119. Gao H-L, Yu X-J, Liu K-L, Shi X-L, Qi J, Chen Y-M, et al. PVN Blockade of p44/42 MAPK Pathway Attenuates Salt-induced Hypertension through Modulating Neurotransmitters and Attenuating Oxidative Stress. *Scientific Reports*. 2017; 7(1):43038.
120. Fachinformation Omalizumab: Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xolair>
121. O'Neill LA. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases, *Nature Reviews Drug Discovery*, Volume 5, Pages 549-563
122. Baldrick P, Richardson D Fau - Woroniecki SR, Woroniecki Sr Fau - Lees B, Lees B. Pollinex Quattro Ragweed: safety evaluation of a new allergy vaccine adjuvanted with monophosphoryl lipid A (MPL) for the treatment of ragweed pollen allergy, *Journal of Applied Toxicology*, Volume 27, Issue 4, July/August 2007, Pages 399-409
123. Park BS, Song Dh Fau - Kim HM, Kim Hm Fau - Choi B-S, Choi Bs Fau - Lee H, Lee H Fau - Lee J-O, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex, *Nature*, Volume 458, 2009, Pages 1191-1195
124. Mullarkey M, Rose Jr Fau - Bristol J, Bristol J Fau - Kawata T, Kawata T Fau - Kimura A, Kimura A Fau - Kobayashi S, Kobayashi S Fau - Przetak M, et al. Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Volume 304, Issue 3, March 2003, Pages 1093-1102
125. Savov JD, Brass Dm Fau - Lawson BL, Lawson Bl Fau - McElvania-Tekippe E, McElvania-Tekippe E Fau - Walker JKL, Walker Jk Fau - Schwartz DA, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 antagonist (E5564) prevents the chronic airway response to inhaled lipopolysaccharide, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, Volume 289, Issue 2, August 2005, Pages L329-L337
126. Czeslick E, Struppert A Fau - Simm A, Simm A Fau - Sablotzki A, Sablotzki A. E5564 (Eritoran) inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in human blood monocytes, *Inflammation Research*, Volume 55, November 2006, Pages 511-515
127. Bennett-Guerrero E, Grocott Hp Fau - Levy JH, Levy Jh Fau - Stierer KA, Stierer Ka Fau - Hogue CW, Hogue Cw Fau - Cheung AT, Cheung At Fau - Newman MF, et al. A phase II, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study of Eritoran (E5564), a lipid A antagonist, in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass, *Anesthesia & Analgesia*, Volume 104, Issue 2, February 2007, Pages 378-383
128. Wasan KM, Risovic V Fau - Sivak O, Sivak O Fau - Lee SD, Lee Sd Fau - Mason DX, Mason Dx Fau - Chiklis GR, Chiklis Gr Fau - McShane J, et al. Influence of plasma cholesterol and triglyceride concentrations and eritoran (E5564) micelle size on its plasma pharmacokinetics and ex vivo activity following single intravenous bolus dose into healthy female rabbits, *Pharmaceutical Research*, Volume 25, September 2007, Pages 176-182

Danksagung

Der größte Dank gebührt meiner Betreuerin Frau Dr. med. xxxxx xxxxx sowie auch meinem Doktorvater Prof. Dr. med. xxxxx xxxxx für die interessante Themenstellung und die gute Betreuung über einen sehr langen Zeitraum, sowohl während der experimentellen Phase im Labor als auch während der Abfassung dieser Dissertation. Insbesondere Frau Dr. med. xxxxx xxxxx hat mir immer wieder spontan und kurzfristig Ihre wertvolle Zeit gewidmet. Weiterhin möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der „Arbeitsgruppe xxxxx“ der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Mainz meinen Dank aussprechen. Neben Frau Dr. rer. nat. xxxxx xxxxx, die mir im Labor bei technischen Fragen und insbesondere bei der Erstellung von Grafiken immer hilfsbereit zur Seite stand, gilt mein Dank ganz besonders Frau Dr. rer. nat. xxxxx xxxxx. Die Arbeitsatmosphäre war stets angenehm und auf gegenseitige Unterstützung wurde stets großen Wert gelegt. Für die vielen Blutspenden danke ich herzlichst den Mitarbeitern im Labor sowie zahlreichen ehemaligen Kollegen und Kommilitonen. Ein ganz spezieller Dank gebührt auch meiner langjährigen Partnerin, die mich stets unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die uneingeschränkte, vielseitige Hilfsbereitschaft und jegliche Art von Unterstützung, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben von ganzem Herzen danken.

Tabellarischer Lebenslauf

*23. Mai 1987 in Kassel

in Partnerschaft lebend, 1 Tochter

Schulbildung

1994-1995 Grundschule Melsungen

1995-2001 Reformschule Kassel

2001-2004 Elisabeth-Selbert-Schule Zierenberg

2004-2007 Jacob-Grimm-Schule Kassel mit Abitur 2007

Zivildienst

02.01.2008 – 30.09.2008 auf Fehmarn

Berufliche Laufbahn

01.10.2009 – 30.09.2012 Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger bei vitos Kurhessen

01.10.2012 – 30.09.2018 Gesundheits- und Krankenpfleger auf der neurochirurgischen Intensivstation der Universitätsmedizin Mainz

seit Juli 2020 Assistenzarzt für Urologie an den Lahn-Dill-Kliniken Wetzlar

Studium

seit Oktober 2013 Studium der Humanmedizin an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Erstes Staatsexamen (Physikum) im Sommer 2015

01.04.2017 – 31.10.2017 Forschungssemester AG xxxxx an der Universitätsmedizin Mainz zwecks Promotion mit dem Titel „Der Einfluss von Weizen Amylase-Trypsin Inhibitoren auf die Effektorfunktionen Neutrophiler Granulozyten“

Zweites Staatsexamen im Frühjahr 2019

20.05.2019 – 06.09.2019 PJ-Wahltertial in der Urologie am Kemperhof Koblenz

09.09.2019 – 27.12.2019 PJ-Tertial Chirurgie am Kemperhof Koblenz

30.12.2019 – 19.04.2020 PJ-Tertial Innere Medizin an der Universitätsmedizin Mainz

Drittes Staatsexamen und Abschluss des Medizinstudiums am 07.05.2020