

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Prüfung der immunmodulatorischen  
Wirkung von *Coffea praeparata* und Koffein**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

**Peter Dziallas**

Paderborn

Hannover 2015

Wissenschaftliche Betreuung:      Apl. Prof. Dr. med. vet. H.-J. Schubert  
Arbeitsgruppe Immunologie

1. Gutachter:                              Apl. Prof. Dr. med. vet. H.-J. Schubert  
2. Gutachter:                              Jun.-Prof. Dr. Marion Piechotta

Tag der mündlichen Prüfung:        18.05.2015

Gefördert durch die Firma Dr. Schaette AG durch Personal- und Sachmittel

*für meine Mutter*



# Inhaltverzeichnis

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1	Einleitung und Zielsetzung.....	13
2	Literatur.....	14
2.1	Geschichte.....	14
2.2	Inhaltsstoffe von Kaffee.....	14
2.2.1	Chemie.....	14
2.2.2	Pharmakokinetik.....	15
2.3	Adenosin.....	16
2.3.1	Adenosinrezeptoren.....	19
2.3.2	Adenosin und das Immunsystem.....	22
2.4	C-AMP.....	31
2.5	Koffein.....	32
2.5.1	Immunologische Wirkung von Koffein auf Zellen des Immunsystems.....	33
3	Geräte, Material und Methoden.....	36
3.1	Geräte.....	36
3.2	Materialien.....	38
3.2.1	Klinikbedarf.....	38
3.2.2	Laborbedarf.....	38
3.2.3	Reagenzien.....	39
3.2.4	Versuchstiere.....	43
3.2.5	Mono- und polyklonale Antikörper.....	43
3.2.6	Kulturmedien, Puffer und Lösungen.....	45
3.3	Methoden.....	53
3.3.1	Tierversuch.....	53
3.3.2	Gewinnung porziner Leukozyten.....	56
3.3.3	Gewinnung einzelner Leukozytensubpopulationen des Blutes.....	56
3.3.4	Gewinnung von mononukleären Zellen.....	57
3.3.5	Gewinnung von Granulozyten.....	57
3.3.6	Durchflusszytometrie.....	58
3.3.7	Indirekte Membranimmunfluoreszenz (MIF).....	60
	Testdurchführung.....	60

3.3.8	Hämatologisches Profil porzinen Blutes .....	62
3.3.9	<i>In-vitro</i> -Migration der PMN.....	64
3.3.10	<i>In-vitro</i> -Proliferationsmessungen.....	65
3.3.11	Messung der Phagozytosefähigkeit.....	68
3.3.12	Molekularbiologische Verfahren.....	71
3.3.13	Quantitative real time PCR .....	78
3.3.14	Statistische Auswertung .....	82
4	Ergebnisse .....	84
4.1	Expression des Adenosinrezeptors Typ A2a auf porzinen Zellen.....	84
4.2	Einfluss von <i>Coffea praeparata</i> und Koffein auf das hämatologische Profil porzinen Blutes im Tierversuch.....	87
4.2.1	Einfluss auf die Leukozytenzahl (G/l) .....	87
4.2.2	Einfluss auf die absolute und relative Lymphozytenzahl im Blut .....	89
4.2.3	Einfluss auf die absolute und relative Anzahl segmentkerniger Granulozyten im Blut.....	91
4.2.4	Einfluss auf die Monozyten-Anzahl im Blut (G/l).....	93
4.2.5	Einfluss auf die absolute und relative Anzahl eosinophiler Granulozyten .....	95
4.2.6	Einfluss auf die Anzahl basophiler Granulozyten im Blut.....	97
4.3	Einfluss von <i>Coffea praeparata</i> auf die Expression von L-Selektinen <i>ex vivo</i> .....	99
4.4	Einfluss von <i>Coffea praeparata</i> und Koffein auf die Migrationsfähigkeit von PMN 102	
4.5	Einfluss von <i>Coffea praeparata</i> und Koffein auf die Proliferation von mononukleären Zellen im Tierversuch.....	104
4.6	Modulatorische Wirkung von <i>Coffea praeparata</i> und Koffein auf die Phagozytoseleistung im Tierversuch.....	107
4.7	Einfluss von <i>Coffea praeparata</i> auf die mRNA-Expression ausgewählter Gene in Gesamtleukozyten .....	109
4.8	Einfluss von <i>Coffea praeparata</i> auf die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ <i>in vitro</i> ...	112
5	Diskussion .....	114
5.1	Expressionsverteilung des Adenosinrezeptors Typ A2a differiert auf porzinen Immunzellen .....	114
5.2	<i>Coffea praeparata</i> und Koffein beeinflussen insbesondere die Monozytenzellzahl des peripheren Blutes bei mehrmaliger oraler Applikation beim Schwein.....	115
5.3	<i>Coffea praeparata</i> steigert die Expression von L-Selektinen auf MNC <i>ex vivo</i> nach einmaliger Gabe.....	119

5.4	<i>Coffea praeparata</i> und Koffein haben keinen nachweisbaren Effekt auf die Migrationsfähigkeit von Leukozyten.....	120
5.5	<i>Coffea praeparata</i> und Koffein führen zu einer verstärkten Proliferation von mononukleären Zellen .....	121
5.6	<i>Coffea praeparata</i> und Koffein haben nach einmaliger Gabe einen hemmenden Einfluss auf die Phagozytoseleistung im Tierversuch.....	123
5.7	<i>Coffea praeparata</i> reduziert die Genexpression von Prostaglandin-G/H-Synthase- 2, hat jedoch keinen Einfluss auf die Genexpression von IL-6 und Arachidonat-5-Lipoxygenase im Tierversuch .....	124
5.8	<i>Coffea praeparata</i> hat einen hemmenden Effekt auf die Genexpression von TNF- $\alpha$ <i>in vitro</i> .....	126
5.9	Gedanken über den Einsatz von Koffein in der Tiermedizin .....	127
5.10	Konklusion und Ausblick: Einsatz von <i>Coffea praeparata</i> in der Tiermedizin.....	131
6	Zusammenfassung.....	133
7	Summary .....	136
8	Referenzen.....	138
9	Danksagung.....	173

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
A1R	Adenosinrezeptor Typ 1
A2aR	Adenosinrezeptor Typ 2A
A2bR	Adenosinrezeptor Typ 2A
A3R	Adenosinrezeptor Typ 3
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin converting enzyme
ADA	Adenosindeaminase
Ado	Adenosin
Ala	Alanin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
cAMP	Cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
ANOVA	analysis of variance
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
Aqua tridest.	Aqua tridestillata (dreifach destilliertes Wasser)
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	base pairs (Basenpaare)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C5a	opsonisierendes Fragment der Komplementkomponente C5
Ca <sup>2+</sup>	ionisiertes Calcium
CCL	β-Chemokin-Ligand, zwei Cysteinmoleküle in Folge („CC“)
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CFU	colony forming units
CGRP	Calcitonin-gene related peptide
CNS	central nervous system; zentrales Nervensystem
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concavalin A
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin (unmethylierte DNA-Motive v.a. aus Bakterien)
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
Ct	cycle threshold



CXCL	$\alpha$ -Chemokin-Ligand, zwei Cysteinmoleküle werden von beliebiger Aminosäure (X) getrennt
CXCL8	Interleukin-8
DAG	Diacylglycerol
DISC	death inducing signalling complex
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
dsDNA	doppelsträngige DNA
E. coli	Escherichia coli
EDTA	ethylendiamine-tetraacetic acid (Ethylendiamintetraacetat)
et al.	et alii (lateinisch: und andere)
FACScan®	fluorescence activated cell scanner (Fluoreszenzaktiviertes Zellmessgerät)
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon
FCM	flow cytometer (Durchflusszytometer)
FCS	fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-1, -2, -3	Messkanäle des Durchflusszytometers für emittierte Fluoreszenz FL-1 = Grünfluoreszenz, $530 \pm 15$ nm; FL-2 = Orangefluoreszenz, $585 \pm 21$ nm; FL-3 = Rotfluoreszenz, $>650$ nm
fMLP	N-Formyl-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin
for	forward
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan®
g	Gramm
G	Guanin
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor (Granulozyten-Wachstumsfaktor)
ggf.	gegebenenfalls
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen-Wachstumsfaktor)
h	hora (lateinisch: Stunde)

H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
His	Histidin
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal-axis; Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
i.d.R.	in der Regel
I0+	Iscove®-Medium mit L-Glutamin, Antibiotikumzusatz ohne Serum
I10F+	Iscove®-Medium mit L-Glutamin, Antibiotikumzusatz und 10% fetalem Kälberserum
IBD	Inflammatory Bowel Disease
ICAM	intercellular adhesion molecule (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JC-1	5, 5', 6, 6'-Tetrachloro-1, 1', 3, 3'-Tetraethylbenzimidazol-Carbocyanin Jodid
kB	kilo Basen
kDA	kilo Dalton
KM	Körpermasse
L	Liter
LB	lysogeny broth
Leu	Leucin
LFA	Leukocyte function-associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
μ	Mikro (x10 <sup>-6</sup> )
μm	Mikrometer
μl	Mikroliter
m	milli (x10 <sup>-3</sup> )
mAK	monoklonaler Antikörper
MdM	monocyte derived macrophages
Met	Methionin
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIF	Membranimmunfluoreszenz

Min.	Minute (n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Mitochondrienmembranpotential
MNC	mononuclear cells (mononukleäre Zellen, hier: des Blutes)
mol	Mol
mRNA	messenger RNA
mV	Millivolt
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
n	nano ( $\times 10^{-9}$ )
n=	bei Berechnung des Mittelwertes die Anzahl der Einzelbeobachtungen
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Wasserstoff
NANC	nicht-adrenerge, nicht-cholinerge Fasern des peripheren Nervensystems
NEP	neutrale Endopeptidase
NF $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B (Transkriptionsfaktor)
NK	Neurokinin
NKR	Neurokininrezeptor
NP	Neuropeptid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen
PAF	platelet activating factor
PAMP	pathogen associated molecular pattern (Molekulare Muster von Erregern)
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
PGF <sub>2</sub> $\alpha$	Prostaglandin F2 $\alpha$
PHA	Phythemagglutinin
Phe	Phenylalanin
PJ	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12 Myristate-13 Acetat
PMN	polymorphonuclear leukocytes (polymorphkernige neutrophile Granulozyten)
PNS	peripheres Nervensystem
qrtPCR	quantitative real time PCR

r	Korrelationskoeffizient
RA	rheumatoide Arthritis
rev	reverse
ROS	reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S. aureus	Staphylococcus aureus
s.u.	siehe unten
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SNS	sympathisches Nervensystem
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan®
spp.	subspecies (lateinisch: Unterarten)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris Boric Acid EDTA-Puffer
Thr	Threonin
TLR	toll-like-receptor (Toll-ähnlicher-Rezeptor)
TNF	tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TXA2	Thromboxan A2
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
UV	ultra violett
V	Volt
v.a.	vor llem
VEGF	Vascular endothelial groth factor
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
Xaa	variable Aminosäure
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Koffein gehört zu den Methylxanthinen und ist aufgrund des Vorkommens in vielen Genussmitteln, wie Kaffee, Tee und Schokolade, weit verbreitet. Deswegen ist es schon lange ein Forschungsthema zahlreicher Studien, die dessen Einfluss auf biochemische und physiologische Prozesse untersucht haben. Basierend auf diesen Studien kann man Koffein neben den psychoaktiven Effekten auch Einflüsse auf endokrinologische, kardiovaskuläre, respiratorische, renale und gastrointestinale Systeme zusprechen (ARUNA 1997; MANDEL 2002; ZIEGELSTEIN 2004). In Anbetracht der Vielfalt an Auswirkungen von Koffein gab und gibt es diverse Debatten über den generellen Effekt von Koffein auf die Gesundheit des Menschen und des Tieres. Die intensivsten Diskussionen ergeben sich in der Kardiologie; jedoch verdichten sich die Hinweise, dass Koffein und deren Methylxanthinmetaboliten ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf das Immunsystem ausüben können (JAMES 2004; ZIEGELSTEIN 2004).

Ziel dieser Studie ist es, die Folgen einer Koffeinapplikation für das Immunsystem des Nutztieres zu untersuchen. Dabei wurde ein von der Firma Dr. Schaette AG existierendes Präparat zur prophylaktischen Behandlung Tiere verwendet. Es handelt sich hierbei um *Coffea praeparata*, welches ein Decoctum aus *Coffea arabica tosta* ist. Dieses Medikament wurde in zwei verschiedenen Applikationsformen (oral vs. subkutan) und im Vergleich zu der Reinsubstanz Koffein beim Schwein *in vivo* und *in vitro* eingesetzt. Schwerpunkt der Arbeit ist die Charakterisierung der Wirkung von *Coffea praeparata* und Koffein auf Immunzellen und einige ihrer Funktionen *in vivo* und *in vitro*. Im direkten Vergleich mit Koffein als Reinsubstanz soll evaluiert werden, ob Koffein der pharmakologisch wirksame Hauptbestandteil von *Coffea praeparata* ist, oder ob beide Substanzen sich hinsichtlich ihrer immunologischen Wirkung unterscheiden. Im Einzelnen soll geprüft werden, ob die Substanzen die funktionellen Eigenschaften von Leukozyten ändern und ob sie eine proliferations-modulierende Potenz bei lymphoiden Zellen aufweisen. Voraussetzung hierfür ist die genaue Charakterisierung des Wirkmechanismus von Koffein und *Coffea praeparata* auf Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Diese Arbeit soll hierfür einen Beitrag leisten.

## 2 Literatur

### 2.1 Geschichte

1820 gelang es dem Chemiker Friedlieb Ferdinand Runge erstmals, aus Kaffeebohnen reines Koffein zu isolieren. 1832 konnten Pfaff und Justus von Liebig mit Hilfe von Verbrennungsdaten die Summenformel  $C_8H_{10}N_4O_2$  bestimmen. Die chemische Struktur wurde 1875 von Ludwig Medicus als 1,3,7-Trimethylxanthin angenommen, und von Hermann Emil Fischer 1895 durch die erste Synthese des Koffeins bestätigt. Der Wirkungsmechanismus wurde im 20. Jahrhundert erfolgreich erforscht, wobei es der Firma Hoechst im Jahre 1957 gelang, die wichtigsten Primärwirkungen des Koffein in seinem Antagonismus zu Adenosin zu begründen (EICHLER 1976; ZIEGELSTEIN 2004).

### 2.2 Inhaltsstoffe von Kaffee

Vom Kaffeestrauch werden Kaffeebohnen (*Coffea semen*) und Kaffeekohle (*Coffea carbo*) als Arzneimittel verwendet. Wirksame Inhaltsstoffe sind 0,7 - 2,85 % Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin), 3,3 - 7,5 % Chlorogensäure, 0,8 - 1,25 % Trigonellin, Atractylin, Theobromin, Theophyllin, Chinasäure, Vitamin B1 und Vitamin D. Das Kaffeeöl macht 10 - 16 % der Kaffeebohne aus, welches Cafestol, Sitosterin, Stigmasterin, Coffeasterin, Wachs, Kaffeesäure, Coffalsäure und, als Hauptbestandteil des Kaffeearomas, Alpha-Furfurylmercaptan enthält (ARUNA 1997).

#### 2.2.1 Chemie

Koffein ist ein Trivialname, der der Substanz wegen des Vorkommens in Kaffee gegeben wurde, der jedoch keinen Rückschluss auf die chemische Zusammensetzung zulässt. Nach der systematischen IUPAC-Nomenklatur lautet die vollständige Bezeichnung 1,3,7-Trimethyl-2,6-purindion, eine Kurzform 1,3,7-Trimethylxanthin – nach der chemischen Ableitung des Koffeins vom Xanthin. Xanthin gehört zur Gruppe der natürlich vorkommenden Purine, ebenso wie die strukturähnlichen Dimethylxanthine Theophyllin und Theobromin (Abb.1) (BLANCHARD u. SAWERS 1983; BENOWITZ 1990).

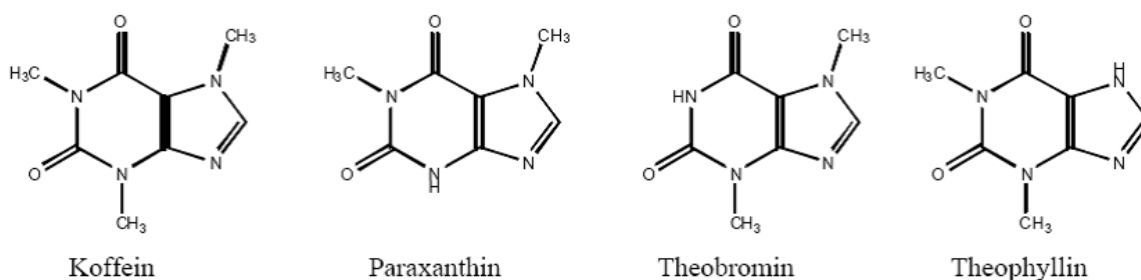
### 2.2.2 Pharmakokinetik

Koffein wird innerhalb der ersten Stunden nach peroraler Applikation zu 99 % resorbiert und verteilt sich gleichmäßig im gesamten Körperwasser (MARKS u. KELLY 1973; BONATI et al. 1982; BLANCHARD u. SAWERS 1983). Die hydrophoben Bestandteile des Koffeins erlauben die Passage durch alle biologischen Membranen und die Blut-Hirn-Schranke wird ebenso mühelos überwunden (LACHANCE et al. 1983; TANAKA et al. 1984) wie die Plazentaschranke (IKEDA et al. 1982; KIMMEL et al. 1984). Es wurden 5- bis 20-fach höhere Koffein-Konzentrationen in Föten als in der Mutter gemessen. Maximale Serumkonzentrationen bei oraler Aufnahme können nach 15 bis 120 Minuten gemessen werden, wobei eine Dosis von 1 mg pro kg Körpermasse (KM) p.o. beim Menschen zu einem Peak-Plasmaspiegel von ca. 1 mg/L führt. Dieser Plasmaspiegel kann tierartlich variieren, beim Pferd wird laut Greene (1993, unveröffentlichte Daten) bei einer Gabe von 4 mg/kg KM ein Spiegel von 10 mg/L Serum erreicht. Bei Rind und Schwein liegen noch keine gesicherten Angaben vor.

Die Halbwertszeit für Koffein variiert von Spezies zu Spezies stark und richtet sich nach der Metabolisierung von Koffein in der Leber durch Demethylierung, Oxidation und anschließender Bildung von Aminouracilen.

Beim Menschen ist eine durchschnittliche Halbwertszeit von 6 Stunden (ARNAUD 1987) angegeben, beim Schwein von 12 (CUNNINGHAM 1968) und beim Pferd sogar von bis zu 48 Stunden. Sie richtet sich in der Regel nach der Aktivität und Quantität des Zytochrom von P 450 CYP 1A2, einem Hämproteinen mit enzymatischer Aktivität (FUHR et al. 1996; MINERS et al. 1996). Beachtenswert ist ein deutlich altersabhängiger Unterschied in der Halbwertszeit von Koffein bei allen Spezies. Dieser Aspekt muss bedacht werden, wenn man die Wirkung von Koffein beim adulten auf das juvenile Tier übertragen will. Man führt dieses auf eine verringerte Aktivität des Zytochroms P 450 im juvenilen Tier zurück (ARANDA et al. 1977; LE GUENNEC u. BILLON 1987). In der Leber wird Koffein in Theophyllin (1,3-Dimethyl-Xanthin), Theobromin (3,7-Dimethyl-Xanthin) und Paraxanthin (1,7-Dimethyl-Xanthin) (70-85 %) abgebaut (FREDHOLM et al. 1999). Wichtig ist hierbei die Tatsache,

dass sämtliche Metaboliten des Koffeins selbst pharmakologische Eigenschaften besitzen (LÖSCHER et al. 1997).



**Abb. 1** Strukturformel von Koffein und dessen Derivaten (mod. nach LÖSCHER et al. 1997).

Sie werden ihrerseits in der Leber durch Monooxygenasen und CYP weiter abgebaut, gelangen jedoch auch in die Blutbahn. Dort können sie eine pharmakologische Wirkung entfalten, die der des Koffeins entspricht (LÖSCHER et al. 1997). Theophyllin ist in der Rolle des Adenosinrezeptorantagonisten 3- bis 5-mal potenter als Koffein. (FREDHOLM et al. 1999) Weniger als 2 % des aufgenommenen Koffeins werden nicht metabolisiert wieder ausgeschieden.

### 2.2.2.1 Wirkungen des Koffeins im Körper

Koffein vermittelt seine pharmakologischen Wirkungen im Körper über zwei Mechanismen. Beide beruhen auf einer starken Strukturhomologie zu folgenden im Körper ubiquitär vorkommenden Stoffen: Adenosin (Abb. 2) und den Second Messenger c-AMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) (Abb. 6) (HORRIGAN et al. 2006). Die Wirkungen von Koffein werden in Abschnitt 2.5 ausführlich behandelt. Für ein besseres Verständnis werden die Funktionen und Wirkungen von Adenosin und cAMP im Folgenden dargestellt.

## 2.3 Adenosin

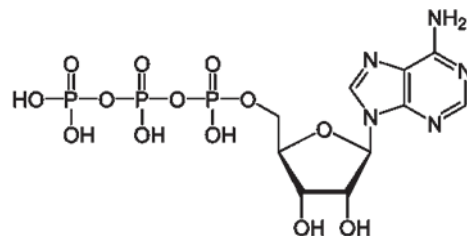
Adenosin ist ein aus der Nukleinbase Adenin und dem Zucker  $\beta$ -D-Ribose bestehendes Nucleosid mit der Summenformel  $C_{10}H_{13}N_5O_4$ .

Es ist einer der Hauptbestandteile der DNA. Sobald eine Zelle stirbt, werden die Nucleotide, und damit auch Adenosin, freigesetzt. Adenosin ist des Weiteren Hauptbestandteil des c-



AMP. C-AMP dient als wichtiger Second-Messenger bei der zellulären Signaltransduktion und führt insbesondere zur Aktivierung von Proteinkinasen. Zur Rolle und Funktion des c-AMP wird in einem späteren Abschnitt ausführlicher eingegangen, da in diesem Second-messenger eine Wirkungsvermittlung von Koffein liegt.

Neben diesen Funktionen besitzt Adenosin eine weitere lebenswichtige Aufgabe. Es ist der Bestandteil des ATP (Abb. 2), das die unmittelbar verfügbare Energie in jeder Zelle darstellt (GARRETT 2009).



**Abb. 2** Strukturformel von ATP (GARRETT 2009).

Werden die Phosphoanhydrid - Bindungen zwischen den Phosphat-Gruppen durch Enzyme hydrolytisch gespalten, entsteht das Adenosindiphosphat (ADP) bzw. das Adenosinmonophosphat (AMP) (HASKO 2007). Bei einer weiteren Spaltung entsteht Adenosin, welches als frei verfügbares Signalmolekül dient (ZIMMERMANN 2000). Adenosin reichert sich auf diesem Weg passiv in Zellen und Gewebsstrukturen hohen Energiebedarfes an, wie etwa Muskelzellen, Nervenzellen und Immunzellen. Zu den Nukleotid -abbauenden Ektoenzymen gehören neben den Ektonukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (E-NTPDase) auch Ectonukleotid-Pyrophosphatasen/ Phosphodiesterasen (E-NPP), alkalische Phosphatasen (ALP) und Ekto-5`-Nukleotidase (5`NT, CD73) (THOMSON et al. 1990).

Das Protein CD73 stellt den letzten Schritt des kaskadenförmigen ATP-Abbaus dar (ELTZSCHIG et al. 2003). Es hydrolysiert AMP zu Adenosin. CD73 ist ein 70 kDa großes, glykosyliertes, Glycosylphosphatidylinositol- (GPI) geankertes Membranprotein, das neben

seiner Funktion als Ekto-Nukleotidase gleichzeitig als Co-Rezeptor in der T-Zellaktivierung und als Zelladhäsionsmolekül dient (SNYDER u. HENDERSON 1973; NARRAVULA et al. 2000). Dieses Ektoenzym wird unter physiologischen und patho-physiologischen Bedingungen auf unterschiedlichen Zelltypen exprimiert. In humanen Geweben wurde es sowohl auf verschiedenen Endothel- und Epithelsubpopulationen als auch auf 15 % der peripheren Blutlymphozyten nachgewiesen (AIRAS et al. 1995; STROHMEIER et al. 1997). Das Gen für CD73 wird auf den meisten B-Zellen (70 %) und CD8+-T-Zellen (51 %), aber auch auf einer CD4+-Subpopulation (11 %) exprimiert (GUTENSOHN et al. 1995; RESTA et al. 1998). Das Molekül unterliegt einem „Turnover“, d.h. es kommt zu einem ständigen Austausch zwischen Zelloberfläche und zytoplasmatischen Membranen (RESTA et al. 1998). Neben dieser membranständigen Form ist noch eine lösliche Variante des CD73 bekannt. Einige Arbeiten liefern Hinweise darauf, dass CD73 an der Regulation von Entzündungsreaktionen beteiligt ist (LUDWIG et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass es bei einer akuten Entzündung zur Aktivitäts- und Expressionssteigerung von CD73 kommt (NARRAVULA et al. 2000). Dadurch kommt es zu einer Erhöhung des extrazellulären Adenosinspiegels. Adenosin wird unter normalen Bedingungen schnell wieder von Adenosindeaminasen abgebaut (HERSHFIELD 1998). Diese sind auf vielfältige Weise an der Zelloberfläche verankert, um in räumlicher Nähe der Rezeptoren wirken zu können. So ist die ADA durch CD26 direkt mit der Zelle verbunden (KAMEOKA et al. 2006).

Es kann mehr ADA an der Zelle gebunden werden, je mehr CD26 vorhanden ist. Die zellulären Level von CD26 verändern sich im Laufe der Reifung einiger Immunzellen, insbesondere der Lymphozyten, und können so eine Rolle bei der negativen Selektion spielen (KAMEOKA et al. 2006). Es weist vieles darauf hin, dass in einem hochkomplexen, regulatorischen Netzwerk der Effekt von Adenosin durch das ekto-ADA, welches an CD26 gebunden ist, einen weiteren modulatorischen Baustein darstellt.

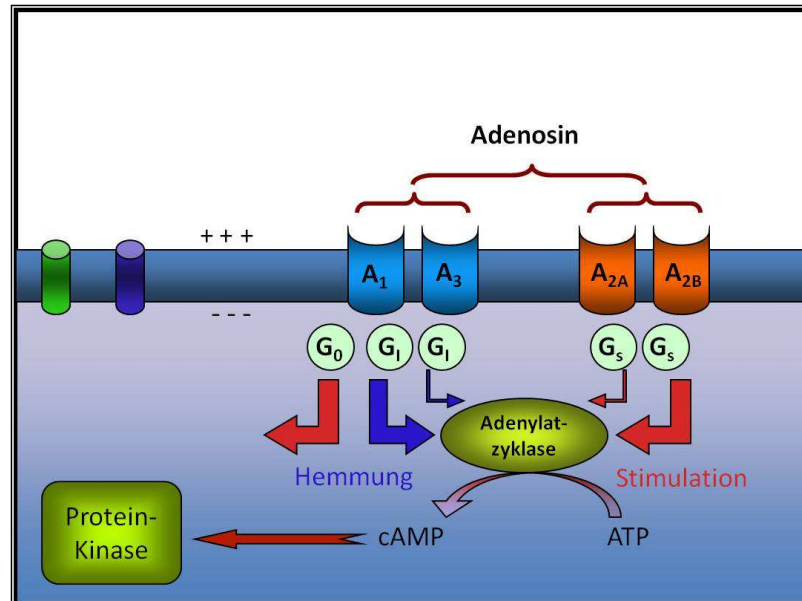
Ergebnisse einer Arbeitsgruppe um Herrera haben gezeigt, dass ADA auch direkt mit den Adenosinrezeptoren (A1 und A2a) gekoppelt sein kann (HERRERA et al. 2001), jedoch sind diese Daten noch nicht reproduziert worden. Die physiologische Halbwertszeit von Adenosin liegt bei wenigen Sekunden, wobei ein durchschnittlicher extrazellulärer Adenosinspiegel im unteren nmol Bereich erreicht wird (MONACO et al. 2004). Dieser recht niedrige

Adenosinspiegel kann bei einer Entzündung oder einem hypoxischen Zustand auf bis zu 100  $\mu\text{mol}$  ansteigen (FREDHOLM et al. 1984; SOTTOFATTORI et al. 2001). Lipopolysaccharide (LPS) von einigen Bakterien in Makrophagen können zu einer vermehrten Ausschüttung von Adenosin führen (MCCOLL et al. 2006). Dies kann ein Escape-Mechanismus sein. Als Escape-Mechanismus versteht man einen Mechanismus, den Krankheitserreger oder Tumoren benutzen, um das körpereigene Immunsystem zu täuschen. Hierdurch wird eine adäquate Immunantwort verhindert.

### **2.3.1 Adenosinrezeptoren**

Adenosin interagiert mit den umliegenden Zellen über sogenannte Adenosinrezeptoren. Hierbei handelt es sich um eine Klasse von G-Protein-gekoppelten, transmembranständigen, hepta-helikalen Rezeptoren, die zu der Familie der purinergen Rezeptoren gehören (FREDHOLM et al. 1984; OLAH et al. 1995). Diese können grob in zwei Klassen unterteilt werden: P1 und P2 (BURNSTOCK 2004). Die P1 Rezeptoren werden durch Adenosin respektive durch dessen Agonisten und Antagonisten angesprochen (BURNSTOCK u. WILLIAMS 2000). Als P2 werden die Rezeptoren betitelt, an welche ATP und AMP binden (LEVINE et al. 1999) (siehe Abb. 3). Es ist eine sehr heterogene Gruppe von Rezeptoren, deren genaue Funktion noch näher untersucht werden muss.

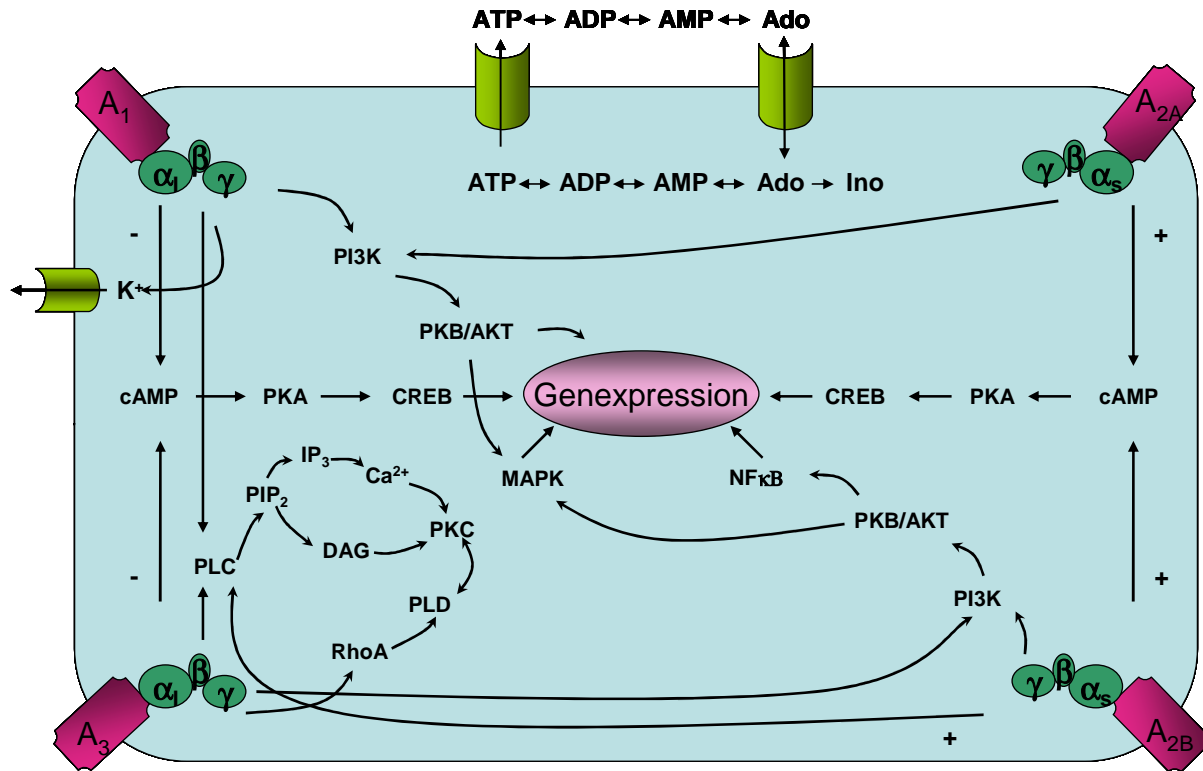
P1 wird in 4 Subtypen unterteilt; dabei handelt es sich um die Adenosinrezeptoren A1, A2a, A2b und A3 (FREDHOLM et al. 2001). Sie besitzen charakteristische Funktionen und Distributionsverhältnisse im Organismus. Der primäre Effektor aller Subtypen ist die Adenylatzyklase, dessen Aktivität je nach Subtyp entweder stimuliert oder gehemmt wird (MERIGHI et al. 2003). Adenylatzyklasen sind an die Zellmembran gebundene Enzyme der Klasse der Lyasen. Ihre Aufgabe ist die Katalyse der Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) (FREDHOLM et al. 2001). Die Funktion dieses Enzyms wird physiologisch im Rahmen der Signaltransduktion durch G-Proteine reguliert (SEXL et al. 1997; FEOKTISTOV et al. 1999; SEIDEL et al. 1999).



**Abb. 3** Signaltransduktionskaskade von Adenosin-Rezeptoren.

Adenosin bindet an die Rezeptorsubtypen und aktiviert sie. Daraufhin werden G-Proteine produziert. Diese können die Adenylatzyklase entweder stimulieren (G<sub>s</sub>) oder hemmen (G<sub>i</sub>). Dadurch kommt es zu einer Aktivierung oder Hemmung der c-AMP Produktion. Gleichzeitig können die G-Proteine Kalzium- und Natriumkanäle öffnen und so die elektrische Aktivität der Zelle zu beeinflussen (mod. nach (HASKO 2007).

Die Rezeptoren A<sub>1</sub> und A<sub>3</sub> vermitteln ein inhibitorisches G-Protein-gekoppeltes Signal (MUNSHI et al. 1991), das zu einem Abfall des c-AMP in der Zelle führt. Die Rezeptoren A<sub>2a</sub> und A<sub>2b</sub> hingegen bewirken eine G-Protein-gekoppelte Stimulation der Adenylatzyklase, wodurch eine Steigerung des intrazellulären c-AMP-Spiegels zustande kommt (SEXL et al. 1997). Neben diesem Signalweg gibt es noch eine Reihe weiterer Informationswege, die für alle Subtypen beschrieben sind (siehe Abb. 4). Die wichtigsten sind die Öffnung von Kalium- und die Hemmung von Kalziumkanälen bei den inhibitorischen Rezeptoren (A<sub>1</sub> und A<sub>3</sub>). Daraus folgt eine Verringerung der Neurotransmitterfreisetzung (DUNWIDDIE u. MASINO 2001). Die Rezeptoren A<sub>2a</sub> und A<sub>2b</sub> führen hingegen zu einer Steigerung des intrazellulären Kalziumspiegels (LINDEN et al. 1999).



**Abb. 4.** Adenosinrezeptor-Signalwege (K.A. JACOBSEN, GAO, Z.G. 2006).

Aktivierung des A<sub>1</sub>R und A<sub>3</sub>R hemmen die Adenylatzyklase durch die Aktivierung von Pertussis-toxin-sensitiven G-Proteinen, welche zu einer gesteigerten Aktivität der PLC durch G-Protein-Untereinheiten führt. Aktivierung der A<sub>2A</sub>R und A<sub>2B</sub>R steigern die Adenylatzyklaseaktivität und durch die Aktivierung des G-Proteins. Aktivierung des A<sub>2A</sub>R induziert gegebenenfalls die Bildung von Inositolphosphat über Pertussis-toxin-sensitiven G-Proteinen (HAKONARSON u. GRUNSTEIN 1998). A<sub>2B</sub>R induziert die Aktivierung von Phospholipase C (PLC). Alle 4 Subtypen der AR können mit der MAPK (Mitogen-activated protein kinase) interagieren, welches die Rolle des Adenosins bei dem Zellwachstum, Überleben, Zelltod und Differenzierung widerspiegelt (SODERLING 1999; GERMACK u. DICKENSON 2000; LI et al. 2000).

### 2.3.1.1 Verteilung der Adenosinrezeptorsubtypen

Adenosin-Rezeptoren findet man auf fast jedem Zelltyp. Dabei verhält sich ihre Verteilung zum einen von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich, zum anderen kommt es zur Ausbildung unterschiedlicher Adenosinrezeptorsubsets (FREDHOLM et al. 2001). Die bisher gewonnenen Erkenntnisse stammen überwiegend vom Menschen oder von der Maus.

Den Adenosin 1-Rezeptor (A1R) findet man hauptsächlich im Gehirn, im Herzen und den Blutgefäßen. Seine Funktion ist die Regulation unterschiedlicher Mechanismen, wie die ischämische Präkonditionierung im Gehirn oder die kardioprotektive Wirkung (ABBRACCHIO u. CATTABENI 1999). Der A1R ist des Weiteren in die Regulation der Neurotransmission involviert (AMBROSIO et al. 1997). Die Funktion des Adenosin als Vasodilatator in den Blutgefäßen wird ebenfalls dem A1R zugeschrieben (MARSHALL 2000). Der A2aR ist der wichtigste Rezeptor für das Immunsystem und vermittelt immunsuppressive Funktionen (CRONSTEIN 1994; HERRIGAN et al. 2006).

Der A2bR ist von allen Subtypen der am weitesten verbreitete (FREDHOLM et al. 2001). Man findet ihn konstitutiv in jedem Zelltyp auf niedrigem Expressionsniveau (PIERCE et al. 1992). Er beteiligt sich an der Regulation der Chlorid-Kanäle im Darm (STROHMEIER et al. 1997) und der Aktivität des „cystic fibrosis conductance Regulators“ (CFTR) (CLANCY et al. 1999). A2bR induziert in verschiedenen Zelltypen Apoptose (PEYOT et al. 2000) und hat auf viele Zellen eine wachstumshemmende Wirkung (XAUS et al. 1999). Innerhalb des Immunsystems aktiviert er die Degranulation der Mastzellen und ist für die broncho-konstriktive Wirkung des Adenosins des Asthma verantwortlich (FORSYTHE u. ENNIS 1999).

Die A3R sind hauptsächlich im Gehirn lokalisiert, wo sie eine neuroprotektive Rolle bei ischämischen Prozessen spielen und bei der Regeneration oder Apoptose neuronalen Gewebes beteiligt sind (CARR et al. 1997; VON LUBITZ et al. 1999). Im Gegensatz zu den anderen Adenosinrezeptoren ist der A2aR nicht redundant. Wenn dieser Rezeptor ausfällt, kommt es zu keiner Erhöhung im Expressionsmuster der anderen Adenosinrezeptoren. A2aR-knockout-Mäuse zeigen eine höhere Morbidität und Mortalität als die Kontrolltiere (LUKASHEV et al. 2003; MCCOLL et al. 2006).

### **2.3.2 Adenosin und das Immunsystem**

Es ist seit einer Dekade bekannt, dass Adenosin sowohl die Immunantwort im Allgemeinen als auch die Entzündung im speziellen unterdrücken kann (LOKSHIN et al. 2006). Bis zum heutigen Tage werden die Mechanismen erforscht, wie Adenosin bzw. dessen Agonisten und

Antagonisten (Bsp. Koffein) mit Immunzellen interagieren können. Die Entdeckung des c-AMP-PKA-NFκB Weges eröffnete der Entwicklung von zielgerichteten Medikamenten neue Bahnen. Die Rolle des Adenosins im Immunsystem wird als eine „Gegenmaßnahme“ des Organismus gesehen, um als Regulativ in das Entzündungsgeschehen einzugreifen und damit verbundene Gewebsschäden zu begrenzen (HASKO et al. 2002). Adenosin verhindert die Bildung des *tissue factors* auf Monozyten und führt so zu einer Rekonstituierung des Gewebes und einem Ende der Entzündung (PARKS et al. 1985). Es begrenzt die Bildung von weiteren Koagula und Thromben um die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff wieder zu gewährleisten (ZHOU et al. 2004). Da sich Adenosin automatisch in entzündlichen, hochenergetischen, sauerstoffarmen Geweben anreichert, wirkt es als selbstlimitierender Faktor (BROUSSAS et al. 2002).

### **2.3.2.1 Monozyten**

Monozyten sind eine heterogene Population ubiquitär vorkommender mononukleärer Phagozyten, die in diversen immunologischen, homöostatischen und inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielen (MOSSER 2003; STOUT u. SUTTLES 2004). Zirkulierende Monozyten sind eine mobile Reserve für funktionell kompetente Immunozyten. Sie können als Antwort auf eine Anreicherung von Chemokinen oder anderer taktiler Substanzen in das Gewebe einwandern (MULLER u. RANDOLPH 1999). Dort differenzieren sie sich zu Makrophagen aus, wobei deren unterschiedlichen Phänotypen im Gewebe den Einfluss des sie umgebenden Gewebes verdeutlichen (STOUT u. SUTTLES 2004).

Adenosin ist in der Lage, alle Aspekte der Aktivierung von Makrophagen zu regulieren und somit die Entwicklung einer Entzündung zu beeinflussen (HASKO et al. 2002). Der Rezeptorsubtyp A2a spielt laut Literaturangaben hierbei die bedeutendste Rolle (KHOA et al. 2001). Adenosin begünstigt einen anti-inflammatorischen Phänotyp, der durch die verringerte Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren, einer schwächeren Phagozytoseleistung sowie einer steigenden Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 charakterisiert ist.

Die Phagozytoseleistung von Makrophagen wird durch Adenosin reduziert (PIKE et al. 1978). Dies konnte sowohl mit einer direkten in vitro-Stimulation mit Adenosin, als auch über

eine Stimulation mit Adenosindeaminase-Blockern gezeigt werden (LEONARD et al. 1978; SUNG u. SILVERSTEIN 1985). Die Adenosindeaminase-Blocker steigern den Gehalt an extrazellulärem Adenosin, da dies nicht weiter abgebaut werden kann. Man postuliert für die inhibitorische Wirkung auf die Phagozytoseleistung die Stimulation von A2 Rezeptoren, da der Effekt des Adenosins mit einem Proteinkinase-Inhibitor aufgehoben werden kann (SUNG u. SILVERSTEIN 1985). Desweiteren zeigen Studien mit A2 Rezeptor-knock-out-Mäusen eine erhöhte Phagozytoseaktivität (OHTA u. SITKOVSKY 2001).

Eine Forschergruppe fand heraus, dass undifferenzierte Monozyten eine vermehrte Phagozytose zeigen, wenn sie mit einem A1 Rezeptor-Agonisten stimuliert werden. Dies stellt eine neue Erkenntnis über die Rolle des A1 Rezeptors bei der Fc $\gamma$ -Rezeptor-vermittelten Phagozytose dar (J. E. SALMON et al. 1993).

Durchflusszytometrische Untersuchungen haben gezeigt, dass auf juvenilen, undifferenzierten Monozyten vermehrt A1-Rezeptoren gebildet werden, wohingegen auf ausdifferenzierten Makrophagen der A2-Typ deutlich dominiert (EPPELL et al. 1989).

Nach der erfolgreichen Phagozytose von Antigenen werden diese durch die Produktion von freien Sauerstoffradikalen ( $O_2^-$  und  $H_2O_2$ ) eliminiert (FORMAN u. TORRES 2002). Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (oder "reactive oxygen species" ROS) wird durch Adenosin in Monozyten und Makrophagen sehr potent gehemmt (BROUSSAS et al. 1999). Die A2R scheinen dabei eine übergeordnete Rolle zu spielen; jedoch ist dieser Aspekt noch nicht abschließend geklärt (THIELE et al. 2004). Desweiteren wird durch Adenosinstimulation *in vitro* das Zytokin-Expressionsmuster der Monozyten/Makrophagen verändert. So wird die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-12 herab reguliert, wohingegen vermehrt IL-10 produziert wird (LE VRAUX et al. 1993; BOUMA et al. 1994; LE MOINE et al. 1996). Für diese Änderungen im Zytokin-Expressionsmuster ist der A2a-Rezeptor wohl von entscheidender Bedeutung (PRABHAKAR et al. 1995). Bei Versuchen mit Knock-out-Mäusen, welche über keinen A2a-Rezeptor verfügen, wurde nach einer Adenosinstimulation ein verändertes Expressionsmuster der Zytokine gefunden (LUKASHEV et al. 2003; DAY et al. 2004; DAY et al. 2005). Der *tissue factor* ist ein integrales Membranprotein, das nach Blutkontakt zu Koagulation und Thrombosebildung führt (MORRISSEY 2004). Monozyten



bilden in der Regel keinen *tissue factor* aus, sind jedoch nach Stimulation dazu in der Lage und so an der Wundheilung beteiligt (OSTERUD 1998).

Adenosin verhindert die Bildung des *tissue factors* auf Monozyten und führt so zu einer Rekonstitution des Gewebes und einem Ende der Entzündung (PARKS et al. 1985). Es begrenzt die Bildung von weiteren Koagula und Thromben um die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff wieder zu gewährleisten (ZHOU et al. 2004). Wichtig hierbei ist, dass sich Adenosin automatisch in entzündlichen, hochenergetischen, sauerstoffarmen Geweben anreichert. Durch die vermehrte Bildung und den verringerten Abbau, wirkt es als selbstlimitierender Faktor (BROUSSAS et al. 2002).

Für die Revaskularisation des Gewebes ist es wichtig, dass Makrophagen nach Stimulation mit Adenosin und insbesondere A2a-Agonisten vermehrt den vaskulären Wachstumsfaktor (VEGF, vascular endothelial growth factor) ausschütten, welcher im umgebenden Gewebe zu einer Angiogenese führt (SEMENZA 2003). Dies dient unter physiologischen Konditionen einer besseren Blutversorgung gestresster Gewebe, wird aber von Tumoren ausgenutzt um ihre eigene Blutversorgung sicherzustellen (HASHIMOTO et al. 1994; LEIBOVICH et al. 2002). Tumore selbst produzieren große Mengen an Adenosin um die Angiogenese zu begünstigen (LEWIS et al. 1995).

#### **2.3.2.2 Dendritische Zellen**

Auch die dendritischen Zellen verfügen über den Rezeptor A2a (PANTHER et al. 2001). Adenosin unterdrückt die Synthese von IL-12 auf reifen wie auch auf unreifen dendritischen Zellen (PANTHER et al. 2001). IL-12 ist ein essentielles Zytokin für die Entwicklung von Th1 Zellen. Indem Adenosin die Produktion von IL-12 unterdrückt, greift es in die Einleitung der zellgerichteten Immunantwort ein. Es hemmt weiterhin die Expression von Molekülen, die für die Migration der dendritischen Zellen wichtig sind (CCR5, MIP-3 $\beta$ /CCL19, und MDR-1) und verlangsamt so *in vitro* und *in vivo* die Migration von reifen DC's. Dieses hat einen indirekten hemmenden Einfluss auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort (CRONSTEIN 1994; TRINCHIERI u. SCOTT 1995; HOFER et al. 2003).

### **2.3.2.3 Lymphozyten**

#### **2.3.2.3.1 T-Lymphozyten**

Adenosin hat einen stark hemmenden Einfluss auf die T-Lymphozytenfunktion, insbesondere auf die T-Zell-Rezeptor-gesteuerte Proliferation (HUANG et al. 1997), die Synthese von IL-2 (BUTLER et al. 2003), pro-inflammatorischem IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (SAJJADI et al. 1996). Es hemmt ebenso die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, deren Adhäsion an ihre Zielzellen und die anschließende granuläre Exozytose (KOSHIBA et al. 1997; MACKENZIE et al. 2002). Die bedeutende Rolle des Adenosins konnte an einem Modell mit A2a\_Rezeptor-knock-out Mäusen demonstriert werden, denn diesen Mäusen fehlte das regulatorische negative Feedback für das Entzündungsgeschehen, was im Entzündungsmodell zu exzessiven Leberschäden führte (OHTA u. SITKOVSKY 2001).

#### **2.3.2.3.2 B- Lymphozyten**

Auch bei den B-Lymphozyten bewirken hohe Konzentrationen an Adenosin und seiner Agonisten einen hemmenden Effekt auf die Zellfunktion (SEEGMILLER et al. 1977; SAMET 1985). Die zelluläre Proliferation sowie die Antikörpersynthese werden unterdrückt, was in ADA-defizienten Mäusen belegt werden konnte (BLACKBURN et al. 1996; ALDRICH et al. 2003). Die Akkumulation von Adenosin in einem entzündlichen/hypoxischen Gewebe kann so die humorale Immunantwort regulieren (HERSHFIELD 2005).

#### **2.3.2.3.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)**

NK-Zellen haben die Fähigkeit, virusinfizierte und neoplastische Zellen abzutöten. Sie produzieren eine Reihe pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (PAPAMICHAIL et al. 2004). Auch hier stellt sich Adenosin als ein Hemmstoff für die Zellaktivität dar (WILLIAMS et al. 1997). Die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wird reduziert und die zytotoxische Aktivität wird gehemmt (MILLER et al. 1999; LOKSHIN et al. 2006). Ursache für die Hemmung der Zellaktivität ist ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels mit anschließender PKA-Aktivität. Als Folge kommt es zu einer Unterdrückung der NF $\kappa$ B-Antwort (ALBRECHT et al. 1995). Da der A2a-Rezeptor der für

diesen Signalweg (cAMP) dominierende Rezeptorsubtyp ist, wird angenommen, dass die NK-Zellen über ihn beeinflusst werden (HARISH et al. 2003; MINGUET et al. 2005).

#### **2.3.2.3.4 Zytotoxische Effekte auf Lymphozyten**

Während B- und NK-Zellen in der Regel immun gegen hohe Dosen von Adenosin zu sein scheinen, reagieren T-Zellen auf einen hohen Adenosinspiegel mit Apoptose (FLEISHER 1997; S. APASOV et al. 2000a).

Man nimmt an, dass Adenosin präferentiell eine Apoptose in  $CD4^+CD8^+$ -Thymozyten induziert (KIZAKI et al. 1988), wohingegen die Lebensfähigkeit von  $CD4^-CD8^-$ ,  $CD4^+CD8^-$ , oder  $CD4^-CD8^+$ -Thymozyten nicht beeinflusst wird (S. G. APASOV et al. 2000b). Der Grund hierfür ist noch nicht genau beschrieben.

Generell postulieren Kizaki et al., dass es durch die starke Erhöhung der cAMP-Konzentration zu einer Aktivierung von Endonukleasen kommt, die wiederum zu einer internukleosomalen DNA-Fragmentation führen (KIZAKI et al. 1990).

#### **2.3.2.4 Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten stellen die Mehrheit der zirkulierenden Leukozyten dar. Am Entzündungsort initiieren sie die Immunantwort, indem sie Antigene phagozytieren, freie Sauerstoffradikale produzieren und proteolytische Enzyme ausschütten (CASSATELLA 1999). Neutrophile werden als sehr kurzlebige, terminal differenzierte Zellen des Immunsystems mit hoher Bedeutung für dessen Regulation beschrieben (SAWYER et al. 1989). Sie produzieren Zytokine, Chemokine und exprimieren antimikrobielle Proteine sowie extrazelluläre Matrixproteine (WAKSMAN et al. 1990). Neben diesen für den Organismus nützlichen Eigenschaften zeichnen sich die neutrophilen Granulozyten durch enorme destruktive Fähigkeit aus, die signifikante Gewebsschäden verursachen können (ROOS u. DOLMAN 1990; TOTH et al. 2004; FANTONE u. WARD 1985). Eine nicht regulierte Aktivität dieser Zellen ist mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert, wie Ischämie, Sepsis und rheumatoide Arthritis (PILLINGER u. ABRAMSON 1995). Neutrophile können unter anderem  $IL-1\beta$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IL-8$ , Macrophage-inflammatory-peptide-(MIP) $1\alpha$ , MIP- $1\beta$ , MIP- $2\alpha$ , MIP- $3\alpha$ , Arachidonsäurederivate, Leukotriene, Prostaglandine ( $PGE_2$ ) und Thromboxane generieren und ausschütten (BUSSE 1998; FASANO et al. 1998; MALONEY et al. 1998).

Sie haben auf diesem Weg das Potential, die Aktivierung der Immunzellen zu beeinflussen (EDWARDS 1994).

Beim Menschen und bei der Maus sind auf Neutrophilen alle 4 Subtypen der Adenosinrezeptoren nachgewiesen worden. Das Hauptaugenmerk liegt, wie bei allen Immunzellen, auf dem A2a-Rezeptor, der nach Aktivierung zu einem Anstieg des c-AMP führt (IANNONE et al. 1989; GESSI et al. 2000). Der A1-Rezeptor, der durch minimale Adenosinkonzentrationen aktiviert wird, führt zu einer Anregung der Neutrophilenfunktionen. Die Adhäsion an das Endothel wird verstärkt, die Phagozytoseleistung nimmt zu (J. E. SALMON u. CRONSTEIN 1990; CRONSTEIN et al. 1992).

Bei höheren Konzentrationen von Adenosin (durch Entzündungen, Substitution, etc.) wird der A2a –Rezeptor aktiviert, was einen inhibitorischen Effekt auf die Funktion der Neutrophilen (CRONSTEIN et al. 1992) hat.

Dadurch wird die Produktion von TNF- $\alpha$  blockiert und die von MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2 $\alpha$  und MIP-3 $\alpha$  gehemmt (MCCOLL et al. 2006). Es scheint jedoch nur marginale Beeinflussungen auf die Produktion von IL-8, sowie auf die Migration der Zellen von den Blutgefäßen in das entzündliche Gewebe zu geben (MONTESINOS et al. 1997; MCCOLL et al. 2006). Bei Mensch und Maus konnte in einer Reihe von *in vitro*-Versuchen mit den chemotaktisch aktiven Substanzen fMLP, IL-8, und LTB keine Beeinflussung der Wanderung neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden (MOSER et al. 1989).

Die Phagozytoseleistung der neutrophilen Granulozyten wird, wie die der Makrophagen, unter Adenosineinfluss gehemmt. Dies geschieht über eine A2a-Rezeptor-gekoppelte Erhöhung des c-AMP-Spiegels in der Zelle (J. E. SALMON u. CRONSTEIN 1990; CRONSTEIN 1994). Als ein Bestandteil der zellulären Immunität übernehmen sie eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Mikroorganismen (GRIFFIN et al. 1975).

Adenosin hemmt, wie bei den Makrophagen, den oxidativen „burst“ in Neutrophilen Granulozyten. Es herrscht jedoch Uneinigkeit darüber, bis zu welcher Stufe Adenosin die ROS-Bildung und die Degranulation hemmt (CRONSTEIN 1994; BOUMA et al. 1997).

Die LPS- und TNF- $\alpha$  vermittelte Freisetzung von Elastasen, Defensinen und Perforinen wird ebenfalls unterdrückt. Dies geschieht nach Stimulation des A2a-Rezeptors, wie Studien mit

hochaffinen A<sub>2a</sub>-Agonisten und –Antagonisten zeigen konnten (TRAPANI u. SMYTH 2002).

Adenosin beeinflusst über A<sub>2a</sub>-Rezeptor-Agonisten auch die Freisetzung von Arachidonsäuren (AA) sowie Leukotrienen; hier konnte sogar ein kompletter Stopp der Produktion nachgewiesen werden (FONTEH et al. 1993; KRUMP et al. 1996). Die 5-Lipoxygenase-Translokation im neutrophilen Nukleus wird negativ beeinflusst, sodass die LT-Biosynthese gestoppt wird (FLAMAND et al. 2000).

Im Gegensatz zu den beobachteten Ergebnissen über den hemmenden Einfluss von Adenosin auf den Lipoxigenase-Weg, führt eine A<sub>1</sub>- und A<sub>2a</sub>-Rezeptor-vermittelte Stimulation sowohl auf mRNA Ebene, wie auch auf Ebene des exprimierten Proteins zu einer vermehrten Ausschüttung von Cyclooxygenase-2 (COX2) (CADIEUX et al. 2005). Dies bedeutet jedoch keine erhöhte Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Wie bereits erwähnt, führt die Aktivierung von A<sub>2a</sub>R zu einem Block der AA-Freisetzung, was sich negativ auf die Produktion von Eikosanoiden auswirkt (POULIOT et al. 2002). Auf der anderen Seite kann jedoch eine erhöhte PGE<sub>2</sub>-Biosynthese durch eine exogene Erhöhung des AA-Levels erreicht werden. In einem entzündlichen Milieu wird AA von beschädigten Zellen freigesetzt und steht so den Neutrophilen zur Verfügung. In dieser Situation metabolisieren inflammatorische Neutrophile AA und generieren PGE<sub>2</sub>; letzteres läuft über den COX-2 Pfad, anstelle des durch Adenosin gehemmten 5-LO Pfades (POULIOT et al. 2002). PGE<sub>2</sub> selbst ist ein potenter Immunmodulator, der die Chemotaxis, Aggregation, ROS-Bildung, Lysosomenfreisetzung, LTB und Zytokingeneration unterdrückt. Adenosin scheint in der Lage zu sein, in das entzündliche Gewebe einwandernde neutrophile Granulozyten zu PGE<sub>2</sub>-produzierenden Zellen zu transformieren (CADIEUX et al. 2005).

Dieser Shift im Eikosanoidprofil von LPB zu PGE<sub>2</sub> kann eine wichtige Bedeutung für die Begrenzung einer Entzündung haben und ist eine der wesentlichen anti-inflammatorischen Aktivitäten von Adenosin (CADIEUX et al. 2005).

#### **2.3.2.5 Endothelzellen**

Man hat bis *dato* auf Endothelzellen den A<sub>2a</sub>R und A<sub>2b</sub>R gefunden (OLANREWAJU et al. 2000). Einige Studien erwähnen auch das Vorhandensein von A<sub>1</sub>R und A<sub>3</sub>R. Sie wurden

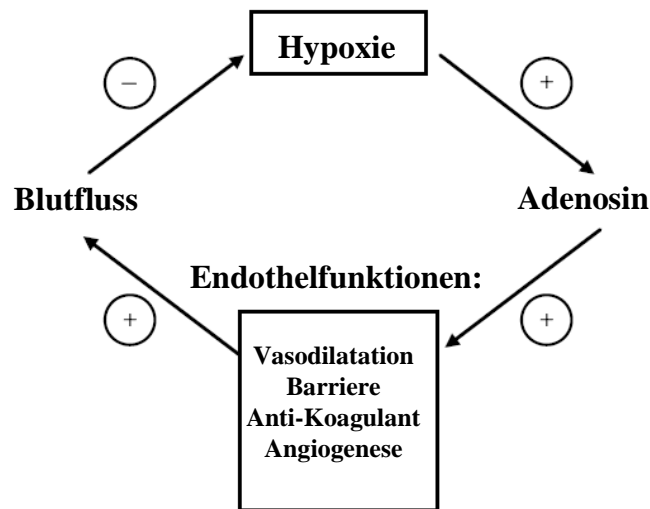
jedoch nur über die Rezeptor-mRNA nachgewiesen, direkte, funktionale Rezeptoren wurden nicht gefunden (SCHADDELEE et al. 2003).

Adenosin kann sowohl autokrin als auch parakrin Endothelzellen beeinflussen. Die Modulation des vaskulären Tonus war historisch gesehen die erste Funktion, die man dem Adenosin zugesprochen hat (DRURY u. SZENT-GYORGYI 1929).

Durch Stimulation mit verschiedenen Zytokinen verändert sich die Ausprägung der Adenosinrezeptoren auf den Endothelzellen. Die Th1 Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  erhöhen die Expression von A2aR und A2bR, wohingegen IFN- $\gamma$  und hypoxische Zustände die Expression von A2bR erhöhen, die von A2aR jedoch hemmen (NGUYEN et al. 2003).

Während einer Entzündung rollen Leukozyten an der Oberfläche von Endothelien entlang. Gelangen sie an den Ort der Entzündung, verlangsamen sie ihre Rollbewegung, bleiben schließlich stehen und migrieren zwischen Endothelzellen in das Gewebe (MCEVER et al. 1995). Dieser Vorgang wird durch bestimmte Oberflächenmarker erreicht, die auf Endothelien, wie auch auf Immunzellen exprimiert werden. Die wichtigsten Oberflächenmarker auf Seiten der Endothelzellen sind die E- und P- Selektine und auf Seiten der Immunzellen die L-Selektine (SPRINGER 1995). Wird nun auf den Zellen die Anzahl der exprimierten E-, L- und/oder P- Selektine erniedrigt, wird so indirekt die Migration der Zellen in das Gewebe negativ beeinflusst. Dieser Effekt der negativen Regulation wird durch A2aR vermittelt. Sowohl in Leukozyten wie auch auf Endothelzellen kommt es zu einer cAMP-vermittelten Expressionsreduzierung (BOUMA et al. 1996).

Adenosin erhöht nicht nur die VEGF-Produktion der Leukozyten, sondern auch die Freisetzung von angiogenetischen Faktoren wie dem *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *insulin-like factor-1* aus den Endothelzellen (Abb. 5) (FEOKTISTOV et al. 2002; ADAIR et al. 2005). Diesen Mechanismus nutzen Tumorzellen, indem sie große Mengen Adenosin freisetzen und so die Angiogenese und damit ihre eigene Nährstoffversorgung begünstigen. (LEIBOVICH et al. 2002).



**Abb. 5** Adenosinabhängige Regulierung der Endothelfunktion mit dem Ziel der Homöostase sicherung (HASKO 2007).

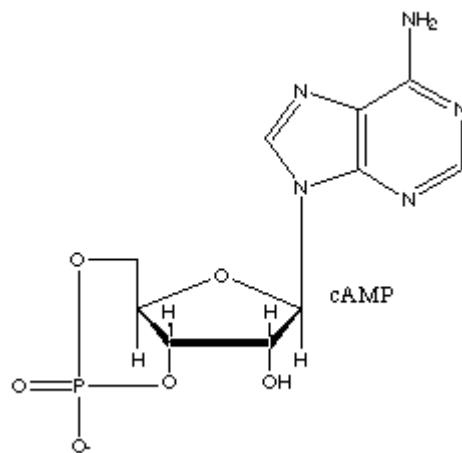
Adenosin wirkt als selbstlimitierender Faktor bei entzündlichen, hochenergetischen, sauerstoffarmen Bedingungen. Es verhindert die Bildung des *tissue factors* auf Monozyten und begrenzt die Bildung von weiteren Koagula und Thromben um die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff wieder zu gewährleisten.

## 2.4 C-AMP

C-AMP vermittelt als *second messenger* mehrere Transduktionswege. Es steuert die *cyclic-nucleotide gated* (CNG) Ionenkanäle (KAUPP u. SEIFERT 2002) und *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) (DE ROOIJ et al. 2000) und bedingt eine Aktivierung der c-AMP abhängigen Protein Kinase A (PKA). PKA ist eine Serin/Threonin Kinase, bestehend aus zwei katalytischen Untereinheiten (C), die von einem Dimer aus regulatorischen Untereinheiten (R) in einem inaktiven Stadium gehalten werden. Dieser R2C2-Komplex ist inaktiv, die regulatorischen Untereinheiten blockieren die katalytischen Zentren. Die kooperative Bindung zweier Moleküle c-AMP an die R-Untereinheiten führt durch Dissoziation des Komplexes in R2 und zwei aktive C-Untereinheiten zur Aktivierung der PKA. Die PKA wird bereits durch c-AMP-Konzentrationen in der Größenordnung von 10 nM (10<sup>-9</sup> mol/L) aktiviert (CORBIN et al. 1973; BECKER et al. 1990). Wichtige zelluläre Prozesse wie der Metabolismus, Ionenkanalleitfähigkeit, synaptische Transmission,

Zellwachstum, Zellteilung, Gentranskription und einige andere Prozesse werden durch PKA vermittelte katalysierte Phosphorylierung moduliert (SCOTT 1991; HAYNES et al. 1992).

Die c-AMP-abhängige Signaltransduktion wird durch das Absenken des c-AMP-Spiegels gestoppt. In der Zelle vorhandene Phosphodiesterasen (PDE) reduzieren das c-AMP zu AMP (MONS u. COOPER 1995). Horrigan beschreibt, dass der Anstieg des zellulären c-AMP-Spiegels zu einer agonistischen Wirkung auf alle A2aR-vermittelten Aktionen führt. (HORRIGAN et al. 2006).

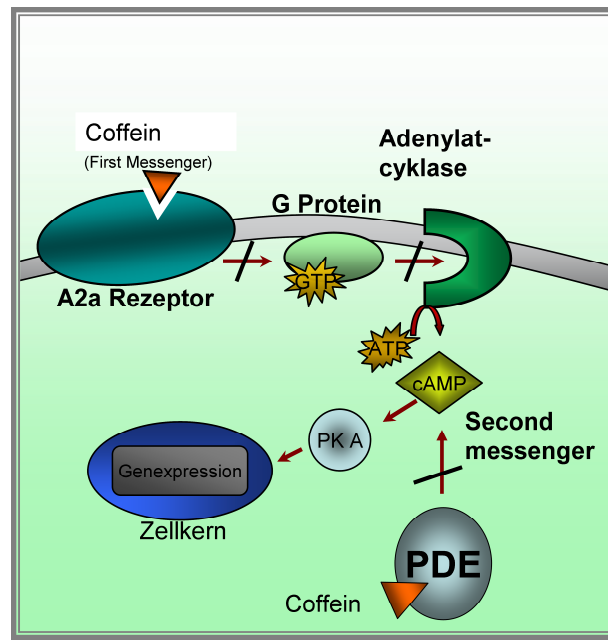


**Abb. 6** Strukturformel vom zyklischen Adenosinmonophosphat (GARRETT 2009).

## 2.5 Koffein

Koffein vermittelt seine Wirkungen auf den Körper über 2 Wege. Zum einen ist Koffein ein Antagonist für Adenosin (FREDHOLM et al. 1999), zum anderen ein Hemmer der c-AMP-PDE (WELLS et al. 1975; FREDHOLM 1978). Dies führt wie bereits beschrieben zu einer Aktivierung der PKA (HORRIGAN et al. 2004). Die Hemmung der PDE liegt in der Strukturhomologie zu Koffein begründet. Es bindet an die PDE, wird jedoch nicht von ihr abgebaut (WELLS et al. 1975). Koffein gelangt über dieselben Mechanismen in die Zelle wie Adenosin (FREDHOLM 1985).





**Abb. 7** Wirkungsvermittlung des Koffeins auf die Immunzelle.

Koffein bindet als Antagonist an den A2aR und blockiert somit die Aktivierung des G-Protein-Komplexes und der Adenylatzyklase. Gleichzeitig hindert in die Zelle gelangtes Koffein die PDE, es kommt zu einer c-AMP Anreicherung (HASKO 2007).

### 2.5.1 Immunologische Wirkung von Koffein auf Zellen des Immunsystems

Die Menge an Studien, die es über den Einfluss von Koffein auf das Immunsystem gibt, ist begrenzt. Derzeit veröffentlichte Studien haben den Einfluss von Koffein auf das Immunsystem beim Menschen und bei Nagetieren (Vergleichsmodell) zum Thema. Es ist zu berücksichtigen, dass bei den meisten Studien der tägliche, durchschnittliche Konsum an Kaffee zugrunde gelegt wird nicht die pharmakologisch wirksame Menge Koffein (HARRIGAN et al. 2006). Bis *dato* wurden zudem hauptsächlich *in-vitro*-Studien durchgeführt.

Einige der Effekte von Koffein auf das Immunsystem beruhen, wie bei anderen Organsystemen, nicht in einem Antagonismus zu Adenosin, sondern auf dem hemmenden Effekt, den Koffein auf die c-AMP-PDE hat. So verursacht Koffein einen zellulären Anstieg

des c-AMP-Spiegels und führt so zu einer agonistischen Wirkung auf alle A<sub>2a</sub>R-vermittelten Aktionen (HORRIGAN et al. 2006).

Bisherige Studien haben ergeben, dass niedrige Dosen Koffein die Produktion von TNF- $\alpha$  in LPS-stimulierten Monozyten unterdrücken können (HORRIGAN et al. 2004), höhere Dosen hingegen haben keinen Einfluss auf die TNF- $\alpha$  Produktion (MEINERS et al. 2004). Weiterhin unterdrückt Koffein die Chemotaxis von fMLP-stimulierten Monozyten (HORRIGAN et al. 2006). Bei *in vivo*-Versuchen ist eine Erhöhung der Monozyten-Zellzahl im Blut nach Koffeingabe festgestellt worden (24 h nach Gabe) (RAMANAVICIENE et al. 2004).

Bei den durchgeführten *in-vitro*-Studien kann kein Effekt von Koffein auf die NK-Zell-Zytotoxizität nachgewiesen werden (KANTAMALA et al. 1990). Zu anderen Ergebnissen kommen die durchgeführten *in-vivo*-Studien; während niedrige (2 mg/Kg) und hohe (18 mg/kg) Dosen an Koffein die Zytotoxizität nicht beeinflussen, kann in einer mittleren Konzentration (6 mg/kg) eine Hemmung festgestellt werden (KANTAMALA et al. 1990).

Die Mastzellen reagieren auf Koffein mit einer Verringerung der Histaminfreisetzung, die mastzellvermittelte Hypersensibilitätsreaktion nimmt ebenfalls ab (SAXENA et al. 1984; SHIN et al. 2000).

In Bezug auf die neutrophilen Granulozyten zeigen die Studien, dass bei niedrigen Konzentrationen an Koffein (<5  $\mu$ g) beim Menschen keine Veränderung in der ROS-Produktion festgestellt werden kann (SULLIVAN et al. 1992; JAFARI u. RABBANI 2000). Jedoch wird eine vermehrte Freisetzung von Myeloperoxidase gemessen (SULLIVAN et al. 1995). Myeloperoxidase katalysiert die Oxidation von Chloridionen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid. Die gebildeten Hypochloritionen oxidieren verschiedene Biomoleküle und tragen somit zur Erkennung und Aufnahme apoptotischen Materials durch Phagozyten bei. Koffein unterdrückt die Chemotaxis von fMLP-stimulierten neutrophilen Granulozyten (SULLIVAN et al. 1992; HORRIGAN et al. 2006). Bei *in-vivo*-Versuchen wurde eine Erhöhung der Neutrophilenzellzahl im Blut 24 h nach Koffeingabe festgestellt (RAMANAVICIENE et al. 2004).

Die T-Zellen wurden durch Koffeingabe nach ConA-Stimulation an der Produktion der Zytokine IL-2, IL-4 (ROSENTHAL et al. 1992) sowie der Zytokine IL-5 und IFN- $\gamma$

gehemmt (HORRIGAN et al. 2006), die Produktion von IL-1 $\beta$  ist hiervon nicht betroffen (VAN FURTH et al. 1995).

Einige *in-vitro*-Versuche mit separierten Milzzellen zeigen eine Reduktion der Antikörperproduktion (SAXENA et al. 1984; ROSENTHAL et al. 1992), was auf eine Beeinflussung der B-Zell-Aktionen durch Koffein hindeutet. Korrespondierend hierzu zeigen *in-vivo*-Studien auf, dass eine niedrige Koffeinkonzentration (<5  $\mu$ M) die Antikörperproduktion steigert, höhere Dosen diese hingegen hemmen (LAUX et al. 1973; SAXENA et al. 1984).

Koffein unterdrückt die Proliferation von MNC sowohl in Anwesenheit von PHA (T-Zell Mitogen) als auch von PWM (T- und B-Zell Mitogen); dieses spricht für eine Unterdrückung der Proliferation bei T- und B-Zellen durch Koffein (KANTAMALA et al. 1990; ROSENTHAL et al. 1992; HORRIGAN et al. 2006). Eine Erhöhung der Lymphozytenzellzahl im Blut nach Koffeingabe konnte in *in-vivo*-Versuchen nachgewiesen werden (BISHOP et al. 2005).

Zusammenfassend hat eine Reihe von *in-vitro* und *in-vivo*-Studien demonstriert, dass Koffein und seine Metaboliten sowohl für das angeborene, wie auch das erworbene Immunsystem eine modulatorische Wirkung haben. So unterdrückt es die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Monozyten, hemmt die Produktion pro-inflammatorischer Zytokinen, hemmt die T-Zell-Proliferation und beeinträchtigt die Produktion von IL-2, IFN- $\gamma$ , IL 4, IL 5 und IL 10. Einige Studien konnten auch eine verminderte Antikörperproduktion nachweisen. *Summa summarum* deutet dies darauf hin, dass Koffein, wie auch alle weiteren Methylxanthine eine anti-inflammatorische Wirkung besitzen (HORRIGAN et al. 2006)

Im Hinblick auf Koffein, Adenosin, Adenosinrezeptoren und dem Schwein wird ein Hauptaugenmerk der Forschung auf das Herz, die Lunge oder die Fortpflanzung und Fertilität gelegt, hierzu liegen diverse Studien vor. Die Interaktionen von Adenosin und Koffein mit dem porcinen Immunsystem sind nur in wenigen Studien gezielt untersucht worden (ONDRACKOVA et al. 2012; ONDRACKOVA et al. 2013) und sollen aus diesem Grunde hier mit Schwerpunkt auf Veränderungen im Zellbild und einiger ausgewählter immunologischer Funktionen zu neuen Erkenntnissen führen.

### 3 Geräte, Material und Methoden

#### 3.1 Geräte

<i>Aqua dest. Aufbereitungsanlage Umkehr-Osmose Anlage, „Typ RO 50/14SMB Typ I“</i>	(Wasser und Regenerierstation, Barsbüttel)
<i>Aqua tridest. Aufbereitungsanlage „SG Reinstwasser System Typ SG-RS90-4 UF“</i>	(Wasser- und Regenerierstation, Barsbüttel)
Autoklav Typ GE406	(Getinge AB, Getinge/Schweden)
Biometra T-Gradient	(biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen)
BioPhotometer	(Eppendorf, Hamburg)
Brutschrank mit CO <sub>2</sub> -Begasung, Baureihe 5060	(Heraeus, Hanau)
Bunsenbrenner mit automatischer Zündung	(Wartewig (6.001.000), Göttingen)
Centricon®– Filtrationssystem	(Amicon, Beverly/MA, USA)
CO <sub>2</sub> -Flasche zur Sterilfiltration	(Kohlensäurewerke Hannover, Hannover)
Druckbehälter zur Sterilfiltration „stainless steel pressure vessel“	(Alloy Products (XX670053) Wisconsin, USA)
Eismaschine Typ UBE 30-10	(Ziegra, Isernhagen)
<i>Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell FACScan®, mit angeschlossener Computereinheit</i>	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop Eclipse 80 i mit Phasenkontrasteinrichtung	(Nikon GmbH, Düsseldorf)
Heißluftsterilisator „Typ ST5050“	(Heraeus, Hanau)
Heizblock Techne Dir-Block DB.3	(Thermo Dux, Wertheim)
Invertmikroskop	(Zeiss, Oberkochen)
Kühlschrank mit Gefrierfach (-20°C)	(Einzelhandel)
Kühlzentrifuge Varifuge K mit Tragwinkelrotor, Hochgeschwindigkeitsaufsatz und Mikrotiterplattenrotor	(Heraeus Instruments, Osterode)
Laborfeinwaage „B6“	(Mettler, Zürich/Schweiz)
Labor-pH-Meter „766 Calimatic“	(Knick, Berlin)
Laborwaage „BL310“	(Sartorius GmbH, Göttingen)

## Geräte und Material

---

MACS <sup>®</sup> MultiStand Metallständer	(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
Magnetrührer mit Heizplatte	(Janke und Kunkel, Staufen)
Microcomputer Gelelektrophoresis power supply consort	(Keutz Laborgeräte, Reiskirchen)
<i>MIDI MACS<sup>™</sup> Separations-Einheit</i>	<i>(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)</i>
Mini-Sub <sup>®</sup> Cell GT Gelelektrophorese-Kammer	(BioRad Laboratories GmbH, München)
Minizentrifuge	(National Labnet CO., Woodbridge, NJ, USA)
Molecular Imager Gel Doc XR	(BioRad Laboratories GmbH, München)
Nihon Kohden MEK-6180g	(Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan)
Pipette, einstellbar „Transferpette <sup>®</sup> “ (2-20 µl)	(Brand, Wertheim)
Pipetten, einstellbar „pipetman“ (1-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	(Gilson, Villers Le Bel/Frankreich)
Pipettierhilfe „accu-jet <sup>®</sup> “	(Brand, Wertheim)
Plastikbox mit Gittereinsatz	(Einzelhandel)
Plattenzentrifuge mit Plattenrotor (UJ II KS)	(Heraeus-Christ, Osterode)
Reinwerkbank Laminair HL2448	(Heraeus-Christ, Hanau)
Rüttler für Mikrotiterplatten „AM69 Microshaker“	(Dynatec, Zug/Schweiz)
Schlauchpumpe zum Absaugen von Flüssigkeiten „Rumo100“	(Heidolph, Schwabach)
Schüttelinkubator RS 90-4 UF	(SG Barsbüttel)
<i>StepOnePlus<sup>®</sup> Real-Time PCR System</i>	(Applied Biosystems, Darmstadt)
Stethoskop	(Littmann)
Thermometer (steril)	(Precision)
Tiefkühltruhe -80°C	(Kendro, Hanau)
Tischzentrifuge „Hermle Z230M“	(Hermle, Gosheim)
<i>Transmigrationskammer 10 wells; 400 µl/285 µl</i>	(Neuro Probe, Gaithersburg, MD/USA)
Uhr	(Einzelhandel)
Zählkammer nach Bürker	(Brand, Wertheim)

Zentrifuge „Megafuge 1.0R“	(Heraeus Instruments, Osterode)
Zentrifuge Multifuge 1 S-R	(Thermo Scientific, Osterode)

### 3.2 Materialien

#### 3.2.1 Klinikbedarf

Butterfly-Kanüle „Micro-Flo™“ 21G 0,8mm	(Fa. Industria Biomedica (AS2102), Mailand/Italien)
Desinfektionslösung Vetisept® 2 %	(Albrecht, Aulendorf)
Kanülen, Neoprint® (0,9x0,4mm, 0,8x40mm)	(Einzelhandel)
Kanülen, Sterican® (0,9x40mm, 1,20x40mm)	(Braun AG, Melsung)
Spritzen, Norm-Ject® (2ml, 10ml, 20ml)	(Henke Sass Wolf, Tuttlingen)
Staukette nach Witte	(Eickemeyer, Tuttlingen)
Vacutainer Brand Luer Adapters	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Vacutainer® System, Halter	(Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
Vacutainerröhrchen, 10 ml, Heparin (170 IU)	(Becton Dickinson, Heidelberg)

#### 3.2.2 Laborbedarf

Abdeckung für PCR-Platten optical adhesive covers	(Applied Biosystems, Darmstadt)
adhäsive Objektträger "HistoBond®"	(Marienfeld (0810000), Lauda-Königshofen)
Combitips, 1,25 ml	(Eppendorf (0030069.420), Hamburg)
Cryo-Freezing-Container	(Nalgen Co., Rochester, USA)
Einmal-Filter, Celluloseacetate Membrane, 0,2 µm, steril	(Renner (26146040), Dannstadt)
Einmal-Küvetten UltraVette 8,5 mm	(Brand (5406120), Wertheim)
Einmal-Pasteurpipetten aus Pe-Ld	(Merck (612F1767), Darmstadt)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 1,5 ml	(Greiner (616201), Frickenhausen)
Flachboden Zellkulturplatten mit Abdeckung, steril 24 Vertiefungen	(Biochrom (P92965), Berlin)
Flachboden-Mikrotiterplatten mit Abdeckung, steril 96 Vertiefungen	(Biochrom (P92960), Berlin)
Laborflaschen mit Gewinde, 500 ml	(VWR international (215L1516), Hannover)

MACS Pre-Separation Filters	(Miltenyi Biotec(130-041-407), Bergisch Gladbach)
MACS Säulen LS Columns	(Miltenyi Biotec(130-042-401), Bergisch Gladbach)
Mikrobank-System Cryobank™	(Mast Diagnostika (291609), Reinfeld)
Pasteurpipetten, 22,5 mm aus Glas	(Brand (747720), Wertheim)
PCR-Platten Micro Amp™ Fast 96-well plate	(Applied Biosystems, Darmstadt)
PCR-Reaktionsgefäß 0,2 ml	(Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (P-8139), Steinheim
Pipettenspitzen 200 und 1000 µl	(Sarstedt (70/762002) (70/760002), Frickenhausen)
Pipettenspitzen safe seal Tipps 10, 100, 1000 µl	(Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)
Polycarbonat-Membran 25 x 80 mm, 3 µm Porengröße, PVP Membranen	(Neuro Probe (PRB3-50), Gaithersburg, MD/USA)
Polystyrolröhrchen	(Nerbe Plus (62 161 0000) Winsen/Luhe)
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5 ml	(Becton Dickinson (352008), Heidelberg)
Rundboden-Mikrotiterplatten mit Abdeckung; steril, 48 Vertiefungen	(Gechno Plastic Products TPP®, Trasadingen/Schweiz)
Rundboden-Mikrotiterplatten mit Abdeckung; steril, 96 Vertiefungen	(Gechno Plastic Products TPP®, Trasadingen/Schweiz)
Saugpipetten, 10 ml	(Sarstedt (86.1254.01), Nürnbrecht)
Transwell Membraneinsätze (permeabel) 3 µm Porengröße	(Coster GmbH (3402), Bodenheim)
Zellkulturflaschen, 200 ml	(Nunc (156499), Wiesbaden)
Zellkulturflaschen, 75 ml	(Nunc (136196), Wiesbaden)
Zentrifugenröhrchen, 15 ml aus Polypropylen (steril)	(Sarstedt (62.554.502), Nürnbrecht)
Zentrifugenröhrchen, 50 ml aus Polypropylen (Falcons, steril)	(Corning (430829), Wiesbaden)

### 3.2.3 Reagenzien

1 Kb Plus DNA Ladder	(Invitrogen (10787-026), Karlsruhe)
Acridin-Orange	(Sigma-Aldrich (A-6014), Steinheim)
Agarose	(Life Technologies (15510-027), Paisely, Scotland)

## Geräte und Material

---

Albumin Fraktion V, bovine, pulv. 98 %	(Roth (8076.2), Karlsruhe)
Ampicillin	(Sigma-Aldrich (A-9518), Steinheim)
Bromphenolblau (3', 3', 5', 5'-Tetrabromhenol-sulfophtalin)	(Severin (15375), Heidelberg)
Concavalin A (ConA)	(Amersham Bioscience (17-0450-01), Freiburg)
CXCL 8, human, rekombinant (rhCXCL 8).	(cell concepts GmbH (C-20008-ME), Umkirch)
Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs)	(Promega (41221), Mannheim)
Dimethylformamid (DMF)	(Sigma-Aldrich (D-4551), Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma-Aldrich (D-5879), Steinheim)
Di-Natriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	(Sigma-Aldrich (S-0876), Steinheim)
E.coli Bakterien zur Plasmidklonierung non-K-12 Wildtyp, W-Stamm	(ATCC No. 9637, S.A. Waksman)
EDTA (Ethylendiamine-Tetraacetic Acid)	(Sigma-Aldrich (ED2SS), Steinheim)
Ethanol 641, absolut, vergällt	(CG Chemikalien, Laatzen)
Ethidiumbromid	(Sigma-Aldrich (E87A51), Steinheim)
FCCP (Carbonylcyanide-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone)	(Sigma-Aldrich (C-2920), Steinheim)
Fetales Kälberserum (FCS), Virus und Mykoplasmen getestet	(Biochrom (S0 113/431B), Berlin)
FITC (Fluoreszein Isothiocyanate)	(Sigma-Aldrich (F7250), Steinheim)
Fluo 4 Acetoxymethyl Ester Calcium Indikator	(Invitrogen (F14201), Karlsruhe)
Formaldehyd 37 %, p.a., ACS, Rotiuran <sup>®</sup>	(Roth (49794.1), Karlsruhe)
Fura red Acetoxymethyl Ester Calcium Indikator	(Invitrogen (F3021), Karlsruhe)
Gel Star <sup>®</sup> Nucleic Acid Stain	(Lonza (50535), Rockland, Maine/USA)
Giemsa-Lösung	(Merck, (52710615), Darmstadt)
Goat-Anti-Mouse IgG/IgM, FITC-konjugiert	(Dianova, (115-095-068), Hamburg)
Hind III Restriktionsenzym aus Haemophilus influenzae	(Invitrogen (15207-012), Karlsruhe)
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	(Invitrogen (15529-019), Karlsruhe)
Iscove <sup>®</sup> DMEM mit L-Glutamin	(PAA Laboratories (E15-819), Linz/Österreich)
JC-1 (5'5'6'6' Tetrachloro-1'1'3'3' Tetraethylbenzimidazol-Carbocyanin Jodid)	(Invitrogen (T-3168), Karlsruhe)



## Geräte und Material

---

Kaliumchlorid (KCl), kristallin	(Biochrom (T046-10), Berlin)
Kaliumhydrogencarbonat reinst (KHCO <sub>3</sub> )	(Merck (3852), Darmstadt)
Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat	(Roth (8174.1), Karlsruhe)
L-Arginin	(Sigma-Aldrich (A5131), Steinheim)
LB Agar	(invitrogen (00705091), Karlsruhe)
LB Base	(Invitrogen (00705241), Karlsruhe)
L-Glutamin	(Biochrom (K0283), Berlin)
L-Histidin	(Sigma-Aldrich (8776), Steinheim)
Lipopolysaccharid von Escherichia coli Serotyp O55:B5	(Sigma-Aldrich (L-2637), Steinheim)
Lymphozytenseparationsmedium	(PAA Laboratories (J15-004), Linz/Österreich)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ), 10 %ig	(Sigma-Aldrich (S-2002), Steinheim)
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	(Sigma-Aldrich (S-2127), Steinheim)
Natriumchlorid (NaCl)	(Roth (9265.2), Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	(Sigma-Aldrich (S-63295), Steinheim)
Natriumhypochlorid (NaClO)	(Sigma-Aldrich (425044)Steinheim)
Mausserum	(hergestellt durch das Anatomische Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover)
May-Grünwald	(Roth (T863.2), Karlsruhe)
Oligo (dt) <sub>12-18</sub> Primer	Invitrogen (18418-012), Karlsruhe)
Plasmidextraktionskit "QIAprep Spin Miniprep Kit"	(Qiagen (27104), Hilden)
Phythemagglutinin	(Amersham Bioscience (27363001),Freiburg)
Phagotest <sup>®</sup> Test Kit for the quantification of Phagocytic activity	(Orpegen, 69115 Heidelberg)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (P-8139), Steinheim
Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung liquid100fach konzentriert	(Invitrogen (10378-016), Karlsruhe)

## Geräte und Material

---

Percoll™ (spezifisches Gewicht: 1,130 g/ml)	(Amersham Bioscience (170-89101), Uppsala/Schweden)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) Dulbecco, ohne Ca <sup>++</sup> /Mg <sup>++</sup>	(Biochrom (L18210), Berlin)
Propidiumiodid (PI)	(Calbiochem (537059), Bad Soden)
QIA Gel Extraction Kit	(QIAGEN GmbH (28704), Hilden)
QIAquick® PCR Purification Kit	(QIAGEN GmbH (28104), Hilden)
QIAprep® Spin Miniprep Kit	(QIAGEN GmbH (28104), Hilden)
Rekombinantes porcines TNF- $\alpha$	(Serotec (PPP003))
RNaqueous® Kit	(Ambion (AM 1912), Austin, Texas/USA)
RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor	(Invitrogen (10777-019), Karlsruhe)
RPMI liquid mit HEPES und L-Glutamin	(Calbiochem (537059), Bad Soden)
ScaI Restriktionsenzym aus <i>Streptomyces caespitosus</i>	(Invitrogen (15436-017), Karlsruhe)
Staphylokokken-Enterotoxin A (SEA), lyophilisiert	(Sigma-Aldrich (S-9399), Steinheim)
Substance P Acetate Salt Hydrate	(Sigma-Aldrich (S6883), Steinheim)
Superscript™ II Reverse Transkriptase	(Invitrogen (18064-014), Karlsruhe)
SYBR Green® PCR Master Mix	(Applied Biosystems (4309155), Darmstadt)
TOPO TA Cloning® Kit	(Invitrogen (K 450641) Karlsruhe)
Tri-Natriumcitrat (2 x H <sub>2</sub> O)	(Serotec (PBP 005), Oxford/UK)
Tris (Trizma Base)	(Sigma-Aldrich (T8524), Steinheim)
Tris Boric Acid EDTA-Puffer (TBE) 10-fach konzentriert	(Bio Rad Laboratories GmbH (161-0770), München)
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid)	(Invitrogen (15520-034), Karlsruhe)

### *Coffea praeparata*

Bei dem eingesetzten Medikament *Coffea praeparata* der Firma „Dr. Schaeffe AG“ handelt es sich um ein Decoctum (Herstellung eines Auszugs von pharmakologischen Substanzen durch Abkochen mit Wasser) aus *Coffea arabica tosta* (Kaffeepflanze) zur subcutanen und peroralen Gabe. Chargen-Nr. 0656 (ArtikelNr. 11114541).

### **Koffein-Lösung**

Die eingesetzte Koffein-Lösung besteht aus Koffein 0,50 % (m/V) in 0,9% NaCl-Lösung. Diese Zusammensetzung wurde so gewählt, dass sie dem Koffein-Gehalt (2mg/ml) des *Coffea praeparata* entspricht.

### **3.2.4 Versuchstiere**

Bei den Schweinen, denen Blut zur Zellgewinnung entnommen wurde, handelte es sich um Tiere der Rasse „Deutsche Landrasse“ und „Deutsches Edelschwein“, sowie aus Hybriden beider Sorten. Alle verwendeten Tiere (n=60) waren klinisch gesund und stammten entweder aus der Klinik für kleine Klautiere, Forensische Medizin und Ambulatorische Klinik oder aus dem Lehr- und Forschungsgut Ruthe der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die Tierversuche wurden mit Hybridschweinen im durchschnittlichen Alter von 5 Wochen durchgeführt (Läuferschwein) (siehe 3.3.1).

### **3.2.5 Mono- und polyklonale Antikörper**

Monoklonale Antikörper wurden für die Charakterisierung von Oberflächenstrukturen porzinen Leukozyten, für die Separation porziner Monozyten aus peripherem Blut und für die Herstellung von Referenzzellen verwendet. Die Antikörper stammen von den Firmen AbD Serotec, Düsseldorf oder Biomol GmbH, Hamburg; ausgenommen derjenigen ohne erkennbare Spezifität. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper und deren Spezifität ist in Tab. 1 dargestellt.

Die Verdünnung erfolgte in MIF-Puffer (3.2.6). Der Antikörper ohne erkennbare Spezifität für Zelloberflächenstrukturen wurde im Rahmen des 3<sup>rd</sup> International Swine CD Workshops (HAVERSON 2001) an teilnehmende Einrichtungen versandt und im Rahmen dieser Arbeit als Isotypkontrolle eingesetzt (MAK: monoklonaler Antikörper; pAk: polyklonaler Antikörper).

Als Sekundärantikörper für die Membran-Immunfluoreszenz sowie die Herstellung von Referenzzellen dienten affinitätschromatographisch gereinigte, polyklonale Antikörper: Ziege-anti-Maus-IgG und IgM (schwere und leichte Ketten). Der mit

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelte Antikörper war gegen Human-, Rinder- und Pferdeserumproteine absorbiert. Dieser Antikörper wurde in der Verdünnung 1:40 (in MIF-Puffer 3.2.6) eingesetzt.

**Tab. 1** Monoklonale Antikörper.

Name (Laborcode)	Spezifität	Donor/Isotyp	Kopplung	Verdünnung <sup>1</sup>	Referenz
pAk A2aR	A2a Rezeptor	Rabbit/IgG	keine	1:10.000	(NOWAK et al. ; GESSI et al. 2000)
mAk EW563 Lecam-1	CD 62L	Maus/IgG <sub>1</sub>	keine	1:10	(SOPP u. HOWARD 2001)
mAk CDSW3#127	Keine <sup>2</sup>	Maus/IgG <sub>2a</sub>	keine	1:10	HAVERSON (2001)
mAk MCA1783F	IFN- $\gamma$	Maus/IgG <sub>1</sub>	keine	1:10	(HASVOLD et al. 2002)
mAk IL-A11 (ILRI)	CD4	Maus/IgG <sub>2a</sub>	keine	1:20.000	(HOWARD u. NAESSENS 1993)
mAk Bo 1	MHC-I	Maus/IgG <sub>1</sub>	keine	1:1	(SCHUBERTH et al. 1991)
mAk MCA 1568PE	humanes CD14 <sup>2</sup>	Maus/IgG <sub>2a</sub>	PE	1:50	(C. N. JACOBSEN et al. 1993)
mAk CC63	CD8+	Maus/IgG <sub>2a</sub>	keine	1:10	(NAESSENS 1993)

---

PE=Phycoerythrin

### 3.2.6 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Alle Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, in *Aqua tridest* angesetzt.

#### Zellkulturmedien und Zusätze

Für die Kultivierung von Leukozyten wurden die Medien RPMI und Iscove® (3.2.3) verwendet. Das eingesetzte fetale Kälberserum (FCS, 3.2.3) wurde bei 56°C für eine Stunde inaktiviert, um Komplementaktivität auszuschließen und eventuell vorhandene Mykoplasmen abzutöten. Ein mit Penicillin-Streptomycin-Lösung (3.2.3) versetztes Medium wurde mit einem hochgestellten ‚+‘-Zeichen gekennzeichnet.

#### **Iscove®-Medium mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (I10F<sup>+</sup>) (3.2.3):**

Iscove® DMEM mit L-Glutamin ad	500	ml
Fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	50	ml
Penicillin-Streptomycin	10	mg

#### **RPMI-Medium mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (R10F<sup>+</sup>) (3.2.3):**

RPMI® liquid mit Hepes und L-Glutamin ad	500	ml
Fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	50	ml
Penicillin-Streptomycin	10	mg

#### **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit EDTA (2 mmol/L) (3.2.3):**

EDTA	292	mg
PBS ad	500	ml

**Lipopolysaccharid-Stammlösung (3.2.3):**

Die LPS-Stammlösung (1 mg/ml PBS) wurde bei -20°C aufbewahrt.

**ConA Stammlösung (3.2.3):**

Bei einer Endkonzentration von 10 µg/ml (ConA) im Versuch und einem eingesetzten Volumen von 25 µl wurden jeweils 7-fach konzentrierte Stammlösungen von ConA in Kulturmedium angelegt.

**PHA Stammlösung (3.2.3):**

Bei einer Endkonzentration von 1 µg/ml (PHA) im Versuch und einem eingesetzten Volumen von 25 µl wurden jeweils 7-fach konzentrierte Stammlösungen von PHA in Kulturmedium angelegt.

**3.2.6.1 Material für die Separation von Zellen**

**Lymphozytenseparationsmedium<sup>®</sup>(3.2.3):**

Lymphozytenseparationsmedium<sup>®</sup> ist eine isotone, wässrige Lösung aus Natriumdiatrizoat und einem hochmolekularen Zucker mit Zusatz des Röntgenkontrastmittels Isopaque. Bei 10°C besitzt das Separationsmedium eine Dichte von 1,077 g/ml. In dieser Arbeit wurde das Lymphozytenseparationsmedium<sup>®</sup> unverdünnt verwendet.

**Percoll<sup>®</sup> (3.2.3):**

Percoll<sup>®</sup> ist ein synthetisches Sol aus Polyvinyl-Pyrrolidon-beschichteten Silikatpartikeln mit einem spezifischen Gewicht von 1,130 g/ml bei 20°C. Durch Zugabe von 0,9 g NaCl pro Liter Percoll<sup>®</sup> wurde die Isotonie erreicht (100 %-iges, isotones Percoll<sup>®</sup>).

**Natriumchloridlösung, 0,9 %**

NaCl	8,77	g
<i>Aqua tridest. ad</i>	1000	ml

**Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne EDTA (3.2.3):**

Die PBS-Trockensubstanz wurde in *Aqua tridest.* gelöst. Es wurden folgende Bestandteile eingewogen:

NaCl	8,0	g
KCl	1,24	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	g
<i>Aqua tridest. ad</i>	1000	ml

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

**Phosphatpuffer, doppelt konzentriert (2 x PBS) (3.2.3):**

Zur Herstellung wurde die doppelte Menge an PBS-Trockensubstanz eingesetzt und auf 1000 ml ergänzt.

**Paraformaldehydlösung zum Fixieren von Referenzzellen (3.2.3):**

Paraformaldehyd	40	mg
PBS ad	1000	ml

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

**Acridin-Orange-Ethidiumbromid-Lösung für die lichtmikroskopische und durchflusszytometrische Zellzählung (3.2.3):**

Acridin-Orange	250	mg
Ethidiumbromid	250	mg
PBS ad	100	ml

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

**3.2.6.2 Lösungen für die Durchflusszytometrie**

Zur Reinigung des Gerätes wurde das Messkanalsystem nach den Messungen mit steril filtriertem *A. tridest.* und 1 %-iger Natriumhypochlorid-Lösung (3.2.3) gespült.

**Trägerflüssigkeit**

Als Trägerflüssigkeit für die durchflusszytometrische Messung wurde steril filtriertes (0,2 µm) PBS mit 0,1 mg/ml NaN<sub>3</sub> (Natriumazid) verwendet (3.2.3).

**Propidiumjodid-Stammlösung (3.2.3):**

Die Stammlösung (100 µg Propidiumjodid/ml Trägerflüssigkeit) wurde in aliquoten Teilen bei -20°C gelagert. Zum Anfärben toter Zellen wurden der Trägerflüssigkeit entsprechende Teile der Stammlösung zugesetzt, um eine Endkonzentration von 2 µg/ml zu erreichen.

**Brefeldin Stammlösung (3.2.3):**

Brefeldin wurde zu 10 mg/ml in Methanol gelöst und mit Kulturmedium auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml verdünnt, aliquotiert und bei -28°C eingefroren. Für den Einsatz in der Zellkultur wurde die Lösung mit Kulturmedium 1:7 verdünnt, so dass ein 7-fach-Konzentrat der Endkonzentration vorlag (3,5 µg/ml), wovon je 25 µl pro Vertiefung einer Rundboden-Mikrotiterplatte eingesetzt wurden (0,5 µg/ml). Für den Einsatz als



Lösungsmittelkontrolle wurde Methanol entsprechend mit Kulturmedium verdünnt, so dass ein 7-fach-Konzentrat von Methanol (0,005 %) vorlag.

**Wasch- und Verdünnungspuffer für die Membranimmunfluoreszenz**

**(MIF-Puffer) (3.2.3):**

bovines Serumalbumin	5,0	g
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	0,1	g
PBS ad	1000	ml

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

**Puffer und Lösungen für die DNA-Analyse (3.2.3):**

**1x TBE-Puffer, pH 8,4**

Der 10-fach konzentrierte TBE-Puffer wurde mit *A. tridest* verdünnt und bei RT gelagert.

**TE-Puffer, pH 7,5**

Tris	10,0	mmol/L
EDTA	1,0	mmol/L

Gelöst in *A. tridest* wurde der Puffer 20 Min. bei 123°C und 2,8 bar autoklaviert, aliquotiert und bei RT gelagert.

**Blaumarker**

Glycerol	30 % (v/v)
Bromphenolblau	1 % (w/v)

Gelöst in 1x TBE-Puffer wurde der Marker bei bei 4°C gelagert.

### **Zusätze, Medien und Nährböden für Bakterienkulturen**

**Ampicillin:** 100 mg/ml in *A. tridest.*, Lagerung bei -20°C.

**IPTG:** 100 mg/ml in *A. tridest.*, Lagerung bei -20°C.

**X-Gal:** 100 mg/ml in Dimethylformamid (DMF), Lagerung bei -20°C.

### **LB-Medium**

Jeweils 20 g LB-Trockenpulver wurden in 1 L *A. tridest.* gelöst und für 20 Min. bei 135°C und 2,8 bar autoklaviert. Nach Abkühlung auf ~55°C erfolgte die Zugabe von Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml. Das Medium wurde bei 4°C bis zu 1 Monat gelagert.

### **LB-Agar**

Es wurden 32 g LB-Agar-Pulver in 1 L *A. tridest* gelöst und für 20 Min. bei 135°C und 2,8 bar autoklaviert. Nach Abkühlung auf ~55°C wurden 100 µg/ml Ampicillin, 80 µg/ml X-gal und 40 µg/ml IPTG zugegeben und das Gemisch unter sterilen Bedingungen zu je 20 ml in Petrischalen gegossen. Anschließend wurden die Platten an einem sterilen Arbeitsplatz für 15 Min. bei Raumtemperatur ausgehärtet. Die Agarplatten konnten für 1 Monat bei 4°C gelagert werden.

### **Phorbol-Myristat-Acetat**

Phorbol-Myristat-Acetat (PMA,3.2.3) greift ohne Beteiligung von Rezeptoren in die Enzymkaskade ein, die an der Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten beteiligt ist (EMMENDORFFER et al. 1990). Durch PMA wird die Proteinkinase C und damit indirekt auch der für die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen wichtige NADPH-Oxidasekomplex aktiviert. Die Stammlösung von 1 mmol/L PMA in DMSO wurde bei -100°C gelagert und bei Bedarf mit PBS auf 100 µmol/L verdünnt. Diese Lösung wurde in aliquoten Teilen zu 200 µL bei -20°C gelagert.

### **Dihydrorhodamin 123 (3.2.3)**

Peroxidasen katalysieren bei Anwesenheit von Sauerstoffmetaboliten die Oxidation des von Zellen aufgenommenen nicht fluoreszierenden Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) zum grünfluoreszierenden Rhodamin 123 (EMMENDÖRFFER et al. 1990). Gekoppelt an die Zellmembran ist dieser Farbstoff durchflusszytometrisch nachweisbar und stellt ein Maß für die ROS-Bildung einer Zelle dar. Mit Hilfe der Trockensubstanz und DMSO wurde eine Stammlösung (1,5 mg/L) hergestellt und in aliquoten Teilen zu 100 µL bei –100°C aufbewahrt. Durch eine Verdünnung mit PBS (1:100) entstand die Gebrauchsausgangslösung, die bei –20°C gelagert wurde.

### **Plasmid für die Herstellung von Standardreihen**

Für die Klonierung von Gensequenzen in chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde das im TOPO-Cloning-Kit (3.2.3) enthaltene Plasmid pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> verwendet (SIPKA 2008).

### **Primer**

Die Oligonukleotid-Primer wurden aufgrund bereits veröffentlichter Sequenzen ausgewählt (KRÜGER 2009). Alle Primer wurden von der Firma MGW aus Ebersberg bezogen. Die optimale Konzentration der Primer im StepOnePlus-PCR System (3.1) wurde durch eine vom Hersteller beschriebene Primer-Optimierung (3.3.12.2.6) ermittelt. Die Sequenzen der verwendeten Primer, die eingesetzte Konzentration sowie die Länge des Amplikons und die Referenzen sind in Tab. 2 dargestellt.

**Tab. 2** Primer Sequenzen und die Konzentrationen für die qRT-PCR.

<b>Gen</b>	<b>Vorwärts- (for) und Rückwärts- (rev) Primer (5' → 3') und Konzentrationen (nmol/L)</b>	<b>Länge des Amplikons</b>	<b>Referenz</b>
PTGS2	for ATGATCTACCCGCCTCACAC (900)	285	(BLITEK et al. 2006)
	rev GAAAAGCAGCTCTGGGTCAAAC (300)		
IL-6	for TGGATAAGCTGCAGTCACAGAAC (300)	108	(MOUE et al. 2008)
	rev ATCCGAATGGCCCTCAGGC (300)		
TNF- $\alpha$	for CTCTTCTGCCTACTGCACTTC (300)	149	(TAYLOR et al. 2009)
	rev GCTTTGACATTGGCTACAACGTG (900)		
ALOX5	for TATCGATGGATGGAGTGGAACC (900)	170	selbst hergestellt Acc. No.:NG_011437
	rev GACTGGAACATGTGCATGAAGC (50)		

<sup>a</sup> Acc. No: Accession-Nummer der Nukleotid-Sequenz der NCBI Gen-Datenbank, welche für die Erzeugung der Primer benutzt wurde.

### **3.3 Methoden**

#### **3.3.1 Tierversuch**

Der Tierversuch wurde an Schweinen im Lehr- und Forschungsgut Ruthe der Tierärztlichen Hochschule vorgenommen (3.2.4). Als Zielgruppe wurden 60 gesunde Absatzferkel im Alter von 5 Wochen ausgewählt, die in 5 Gruppen eingeteilt wurden. Nach dem Absetzen wurde den Ferkeln einige Tage Ruhe gewährt, um die durch Umstallung erzeugten Stressfaktoren möglichst zu minimieren. Um die Rolle genetischer Prädispositionen zu reduzieren, bestand jede Tiergruppe aus Ferkeln verschiedener Würfe. Vor Beginn sowie während des Tierversuches wurde jedes Ferkel einer Allgemeinuntersuchung unterzogen, um offensichtlich kranke Tiere von dem Versuch auszuschließen. Des Weiteren wurde auf ein möglichst homogenes Gewichtsverhältnis in den Gruppen geachtet. Jede Gruppe an Schweinen bekam je eine Substanz (*Coffea praeparata*, Koffein-Zubereitung, physiol. Kochsalzlg.) (3.2.3) in einer bestimmten Applikationsform (per injectionem, subcutan, per os) verabreicht. Die Menge der applizierten Substanzen ergab sich aus den vom Hersteller empfohlenen Dosierungen für *Coffea praeparata* per os und per injectionem. Als Richtwert diente der vom Hersteller angegebene Mittelwert über eine mögliche Darreichungsmenge. Anzumerken ist, dass die Herstellerangaben für die per os applizierte Menge 2,6-mal höher sind als die subcutan verabreichten Mengen.

Der Tierversuch ist durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt worden (Vorgangsnummer 33.12-42T02-04207/1244).

#### **Durchführung**

Aus 60 Ferkeln wurden 5 Gruppen á 12 Tiere gebildet. Bei der Größe der Gruppe wurden Reserven für etwaige Ausfälle, Krankheiten oder Abgänge berücksichtigt, wobei es während des Tierversuches jedoch zu keinen Abgängen in den einzelnen Gruppen kam. Die Haltung erfolgte in den Zwölfergruppen. Bei der Kontrollgruppe erfolgte die Gabe mittels Injektion.

Es war die Applikationsart mit der invasivsten Methode, daher wurden hierbei am ehesten Effekte erwartet. Es ergaben sich die in Tab. 3 dargestellten Gruppen:

**Tab. 3** Tabelle der im Tierversuch eingesetzten Gruppen mit entsprechenden Wirkstoffmengen- und Applikationsart.

<b>Gruppen-Nr.</b>	<b>Applizierte Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Art der Applikation</b>
Gruppe K <sup>ontr</sup> 12 Tiere	Negativkontrolle physiologische Kochsalzlsg.	1,5 ml	per injectionem subcutan (Kniefalte)
Gruppe Cp <sup>sc</sup> 12 Tiere	<i>Coffea praeparata</i> 2 mg/ml Koffein	1,5 ml	per injectionem subcutan (Kniefalte)
Gruppe Cp <sup>oral</sup> 12 Tiere	<i>Coffea praeparata</i> 2 mg/ml Koffein	4,0 ml	Manuelle Eingabe per os
Gruppe Kn <sup>sc</sup> 12 Tiere	Koffein-Zubereitung 2 mg/ml Koffein	1,5 ml	per injectionem subcutan (Kniefalte)
Gruppe Kn <sup>oral</sup> 12 Tiere	Koffein-Zubereitung 2 mg/ml Koffein	4,0 ml	Manuelle Eingabe per os

Die Substanzen wurden je vier Mal in zweitägigen Abständen appliziert, an Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6. Blutproben wurden durch Punktion der *Vena jugularis* respektive der *Vena cava cranialis* unter sterilen Kautelen gewonnen. Eingesetzt wurde das Vacutainersystem mit heparinisierten (Natrium-Heparinat) Röhrchen (3.2.1). Die Blutentnahmen von jeweils 10 ml Blut fanden am Tag 0, Tag 2 und Tag 7 statt. Am Tag 0 und 2 erfolgte dies vor Applikation der Substanzen (Tab 4)

**Tab. 4** Behandlungsschema des Tierversuch.

Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 7
Blutentnahme	Blutentnahme			Blutentnahme
Applikation	Applikation	Applikation	Applikation	

Untersucht werden sollte, ob es nach Applikation zu funktionellen Unterschieden im Hinblick auf das Immunsystem kam. Die Blutentnahme und anschließende Versuchsreihe diente zum Einen der Gewinnung von Erkenntnissen über die Wirksamkeit von *Coffea praeparata* bei einmaliger Applikation. Zum Anderen sollte bei Blutentnahme an Tag 7 ein eventuell vorhandener Langzeiteffekt oder eine Adaptation des Organismus untersucht werden. Nach der jeweiligen Probenentnahme am Lehr- und Forschungsgut Ruthe wurden die Proben schnellstmöglich in das Labor der Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover verbracht und dort verarbeitet. Um die Beeinflussungen auf das angeborene und das erworbene Immunsystem zu untersuchen, wurden die folgenden Parameter untersucht:

- Expression des Adenosinrezeptors Typ A2a auf Leukozyten (angeboren / erworben)
- Einfluss der Substanzen auf das Blutbild (angeboren / erworben)
- Expression von L-Selektinen bei PMN und MNC (angeboren / erworben)
- Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der PMN (angeboren)
- Einfluss auf die Proliferation der MNC (erworben)
- Einfluss auf die Phagozytoseleistung (angeboren / erworben)
- Einfluss auf die Genexpression von TNF  $\alpha$ , IL-6, PGHS-2 und 5-LO (angeboren / erworben)

### 3.3.2 Gewinnung porziner Leukozyten

Gerinnungsgehemmtes (heparinisiertes) Vollblut (10 ml) wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (3.2.2) überführt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Erythrozyten des Vollblutes wurden auf folgende Weise hypoton lysiert:

- Gabe von 20 ml Aqua tridest. in das Zentrifugenröhrchen, 20 sec. schwenken
- Hinzufügen von 20 ml doppelt konzentriertem PBS (2-fach PBS, siehe 3.2.6); 20 sec. schwenken
- Zentrifugation bei 220 x g für 8 Min. (3.1) , anschließend Dekantieren des Überstandes
- Resuspension des Pellets; erneute Lyse wie oben beschrieben
- erneute Zentrifugation, anschließend Waschen des Pellets durch Resuspension in 20 ml PBS, dann bei 220 x g für 8 Min. zentrifugiert
- Wiederholung des Waschvorganges und Einstellung auf die gewünschte Zellzahl

### 3.3.3 Gewinnung einzelner Leukozytensubpopulationen des Blutes

Blutproben wurden durch Punktion der *Vena jugularis* unter sterilen Kautelen gewonnen. (Vacutainersystem mit heparinisierten (Natrium-Heparinat) Röhrchen (3.2.1)).

- Verdünnung des Blutes im Verhältnis 1:2 mit PBS
- Schichtung über Lymphozytenseparationsmedium<sup>®</sup> (3.2.6) in einem 50 ml Röhrchen
- Zentrifugation (30 Min., 4°C) bei 1000 x g ohne Bremse

Durch die Zentrifugation separierten sich die einzelnen Zellpopulationen aufgrund ihrer spezifischen Dichte. Die ‚Interphase‘ mit MNC und Anteilen der Thrombozytenfraktion befand sich zwischen Plasma und Lymphozytenseparationsmedium, Unterhalb des Lymphozytenseparationsmediums<sup>®</sup> befanden sich die Erythrozyten und die PMN.



### 3.3.4 Gewinnung von mononukleären Zellen

- Absaugung der Interphase mit einer weitlumigen Pipette und Überführung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit vorgelegtem PBS (10 ml)
- Auffüllen mit PBS auf 30 ml
- drei Waschschrirte (je 10 Min., 4 °C; 500 x g, 250 x g und 100 x g)
- Entfernung kontaminierender Erythrozyten im Zellpellet durch hypotone Lyse nach dem ersten Waschschrirte (Zugabe von 10 ml *Aqua tridest.* für 20 Sek., anschließend Zugabe von 10 ml 2-fach konzentriertes PBS).

### 3.3.5 Gewinnung von Granulozyten

- Verwerfung des Plasmas, der Interphase und des Lymphozytenseparationsmediums<sup>®</sup>
- Lyse der Erythrozyten aus der verbleibenden Phase durch zweimalige hypotone Lyse mit 20 ml *Aqua tridest.* für 20 Sek.
- Zugabe von 2-fach konzentriertem PBS
- Zentrifugation der Zellsuspension für 10 Min. bei 500 x g bei 4°C
- Dekantieren des Überstandes, Suspendieren des Zellpellet durch Rütteln der Röhrchen und hypotones Lysieren nach Zugabe von 10 ml *Aqua tridest.* (nach 20 Sek. + 10 ml 2-fach konzentriertes PBS)
- zweimaliges Waschen der Zellen mit 20 ml PBS bei 4°C für 10 Min. (250 x g, 100 x g).
- Einstellung der gewünschten Zellzahl (PMN-Populationen mit einer Reinheit von 90 % bis 95).

### 3.3.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen vereinzelt an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Das hierdurch gestreute Licht des Lasers (488 nm Wellenlänge) wird in Richtung des Strahls, als so genanntes Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC), oder im 90° Winkel dazu, als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), erfasst. Durch die Vorwärtsstreuung werden die Größe des Partikels und dessen Refraktionsindex, durch die Seitwärtsstreuung die Komplexität (Oberflächenbeschaffenheit und Granularität) charakterisiert. (SIPKA 2009).

Die Signale werden aufgefangen und an den angeschlossenen Computer weitergeleitet. Mit Hilfe dieses Computers werden die Geräteeinstellungen kontrolliert, Messereignisse erfasst und gespeichert (ORMEROD u. IMRIE 1990). Bei dem für diese Versuche verwendeten Durchflusszytometer handelte es sich um ein FACScan® (3.1) mit einem Argonlaser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm erzeugte. Das Gerät erfasst mit entsprechenden Detektoren Fluoreszenzlicht-Emissionen in drei verschiedenen Wellenlängenbereichen (FL-1=Grünfluoreszenz: 515-545 nm; FL-2=Orangefluoreszenz: 564-606 nm; FL-3=Rotfluoreszenz: >650 nm). Jede Zelle oder jeder Partikel wird folglich durch fünf verschiedene Parameter (FSC, SSC, FL-1, FL-2, FL-3) charakterisiert und als ein Messereignis festgehalten. Mit Hilfe der Software „FACSEXPRESS® Version 3“ erfolgt die computergestützte Auswertung der Daten. Während und nach den Messungen konnten Messereignisse (*Events*) mithilfe sogenannter elektronischer Fenster (*Gates*) eingegrenzt und in mehreren unterschiedlichen Fenstern logisch verknüpft werden (SIPKA 2009, KRÜGER 2008).

#### 3.3.6.1 Quantifizierung vitaler Zellen mittels Referenzzellmethode

Da ein Teil der *in vitro* eingesetzten Zellen im Laufe der Inkubationszeit zugrunde ging, mussten die noch lebenden Zellen von diesen toten Zellen unterscheiden werden, um eine quantitative Aussage über die Menge vitaler Zellen treffen zu können. Es wurde hierzu eine bekannte Menge Zellen, die sich in mindestens einem Parameter von den zu beprobenden Zellen unterschieden, hinzugegeben. Diese beiden Typen an Zellen konnten nun zueinander ins Verhältnis gesetzt werden und so die Menge der vitalen Zellen ermittelt werden.

### 3.3.6.2 Herstellung von Referenzzellen

- Überführung von  $2 \times 10^7$  frisch separierten bovinen mononukleären Zellen des Blutes in ein 15 ml Röhrchen
- Zentrifugation bei  $80 \times g$  für 5 Min. und  $4^\circ\text{C}$  mit anschließendem Dekantieren
- Resuspension des Zellpellets in  $100 \mu\text{l}$  PBS und Zugabe von  $100 \mu\text{l}$  eines monoklonalen Antikörpers Bo 1 (3.2.5)
- Inkubation für 15 min. bei  $4^\circ\text{C}$
- Waschen mit 5 ml MIF-Puffer (3.2.6) anschließendes Zentrifugieren für 7 min. bei  $80 \times g$  und einer Temperatur von  $4^\circ\text{C}$
- Versetzen des Zellpellets mit  $100 \mu\text{l}$  eines 1:40 verdünnten FITC-konjugierten Ziege-Anti-Maus Antikörpers (3.2.5)
- Inkubation für 20 Min. unter Lichtabschluss bei  $4^\circ\text{C}$
- Erneutes Waschen und Resuspendieren in 50 ml PBS
- Erneutes Zentrifugieren und anschließendes Fixieren der Zellen in 30 ml einer 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung (3.2.6)
- Inkubation für 24 h bei  $4^\circ\text{C}$  unter Lichtabschluss mit darauffolgender Zentrifugation
- Erneutes Waschen
- Aufnahme des Zellpellets in PJ-haltige Trägerflüssigkeit ( $2 \mu\text{g/ml}$  PJ) und auf  $4 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt

### 3.3.6.3 Herstellung von Referenzzellen Quantifizierung vitaler Zellen am Durchflusszytometer

Die kultivierten Zellen wurden im Verhältnis von Referenzzellen zu Kulturzellen von ca. 1:1 bis 1:3 eingesetzt. Waren höhere oder niedrigere Zahlen der Kulturzellen zu erwarten, wurde die Zahl eingesetzter Referenzzellen entsprechend angepasst. Nach durchflusszytometrischer Erfassung des Zellgemisches (10.000 Ereignisse) wurde die Zahl der Ereignisse für Referenzzellen (FL1+/PJ+) und für vitale kultivierte Zellen (FL1-/PJ-) nach Setzen eines Fensters auf morphologisch erkennbare Zellen im FSC/SSC-Diagramm gemessen. Die Absolutzahl vitaler Kulturzellen konnte nun wie folgt berechnet werden:

$$\text{Anzahl Kulturzellen} = \frac{\text{Gemessene Ereignisse Kulturzellen} \times \text{eingesetzte Zahl Referenzzellen}}{\text{Gemessene Ereignisse Referenzzellen}}$$

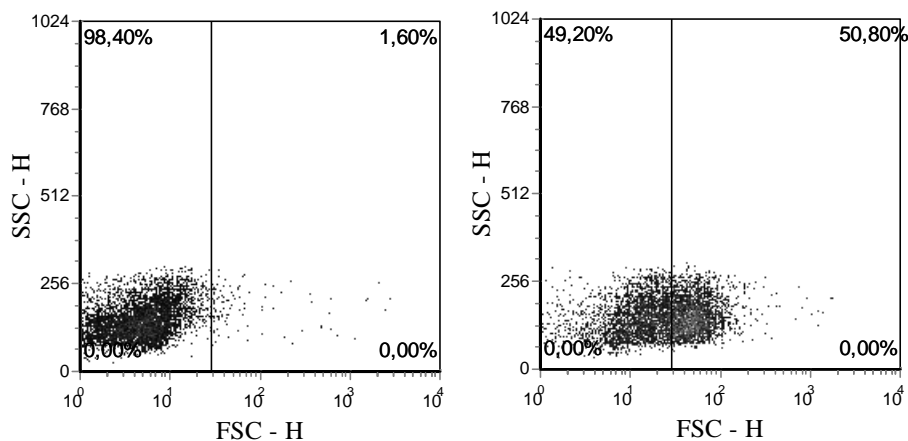
### 3.3.7 Indirekte Membranimmunfluoreszenz (MIF)

Mit der indirekten Membranimmunfluoreszenz wurde der Nachweis exprimierter Oberflächenstrukturen auf Zellen durchgeführt. Es binden hierfür spezifische Antikörper an Strukturen, die ihrerseits von einem zweiten, Fluorochrom-markierten Antikörper erkannt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl MNC, als auch PMN auf das Vorhandensein etwaiger Adenosinrezeptoren des Typs A2a untersucht. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob die Gabe von *Coffea praeparata* während des Tierversuches eine Auswirkung auf die L-Selektin-Exprimierung hatte.

### Testdurchführung

- Überführung von  $2 \times 10^5$  Zellen frisch separierter porziner Blutzellen pro Vertiefung in 96-Well-Rundbodenmikrotiterplatte (3.2.2) in Triplikatansätzen
- Zentrifugation (200 x g; 4 Min., 4°C) mit anschließendem Dekantieren der Überstände
- Waschen der Zellen in 175 µl MIF-Puffer (3.2.6) in der Reihenfolge: Resuspension, Zentrifugation, Abschlagen der Überstände, Resuspension des Bodensatzes

- Zugabe von 25  $\mu$ l eines verdünnten spezifischen primären Antikörpers (3.2.5)
- 20-minütige Inkubation bei 4°C
- Zweimaliges Waschen der Zellen mit 175  $\mu$ l MIF-Puffer
- Zugabe von 25  $\mu$ l eines sekundären FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörpers (3.2.5) und Inkubation bei Lichtabschluss für 4°C für 20 Min
- Zweimaliges Waschen und Aufnahme der Zellen in 150  $\mu$ l Trägerflüssigkeit (2  $\mu$ g/ml PJ) (3.2.6), Überführung in FCM-Röhrchen (3.2.2) und durchflusszytometrische (3.1) Erfassung
- Bestimmung der FITC-positiven, vitalen Zellen



**Abb. 8** Beispielhafte Darstellung eines Dichtediagramms nach Positionierung eines *live gates* für MNC.

MNC wurden nach Separation verdünnt und im Durchflusszytometer mit den Abhängigkeiten Forward (FSC) gegen Side Scatter (SSC) gemessen. Das *live gate* wurde im jeweiligen Kontrollansatz (links) so gewählt, dass ca. 2 % aller nicht stimulierten Zellen im entsprechenden *live gate* dargestellt wurden. Anschließend wurden unter Beibehaltung des *live gates* die jeweiligen Stimulationsansätze (rechts, Beispielhaft ein Ansatz) gemessen. Hier: L-Selektin-Messung bei MNC im Tierversuch (4.3).

### Doppelfluoreszenz-Messungen

Zur Bestimmung zellulärer Subpopulationen wurden Zellen wie oben beschrieben in der indirekten MIF markiert. Der zweite Sekundärantikörper war hier PE-markiert (3.2.3). Sein

Licht konnte im Bereich des Fluoreszenzdetektors FL-2 emittiert und so durchflusszytometrisch erfasst werden. Nach setzen eines Fensters auf vitale, Propidiumjodid-negative Zellen erfolgte die Darstellung in einem korrelierten Punktediagramm (FL1 gegen FL2). Durch das Setzen eines Quadranten konnten die antikörpernegativen von den antikörperpositiven Zellen unterschieden und separat ausgewertet werden.

### **3.3.8 Hämatologisches Profil porzinen Blutes**

Um ein hämatologisches Profil der während der Tierversuche gewonnenen Blutproben zu erhalten, wurden jeweils mindestens 2 ml einer jeden gewonnenen Blutprobe im Labor der „Klinik für kleine Klautiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover“ untersucht, wo zusätzlich ein Differentialblutbild erstellt wurde.

Hierzu wurden ca. 50 µl jeder Probe mittels des „Nihon Kohden MEK-6108 Hämatologieanalysators“ (3.1) vollautomatisch auf folgende Parameter untersucht:

WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC; RDW, PLT und PDW

Anschließend wurde ein Blutausstrich durchgeführt, welcher mittels Pappenheim-Färbung (siehe unten) gefärbt und anschließend manuell differenziert wurde. Hierzu wurden jeweils 200 weiße Blutzellen auf jedem Objektträger bestimmt und anschließend die Prozentzahlen ermittelt.

#### **Anfertigen eines Blutausstriches**

Es wurden jeweils 2 Objektträger (3.2.2) benötigt. Auf einem Objektträger wurde ein Tropfen des zu untersuchenden Blutes appliziert und anschließend mit einem weiteren Objektträger ausgestrichen. Dabei war zu beachten, dass man den zweiten Objektträger mit einem Winkel von ca. 30 Grad langsam über den liegenden Objektträger zog.

#### **Pappenheim-Färbung**

Mit der Pappenheim-Färbung ist es möglich, die verschiedenen Blutzellen und ihre Bestandteile so unterschiedlich anzufärben, dass eine mikroskopische Differenzierung aller Zelltypen erfolgen kann.

### **Durchführung**

Nach ausreichender Lufttrocknung der Blutausrichre für ca. 15 Minuten wurden diese für 3 Minuten in unverdünnte May-Grünwald-Lösung (Firma Merck Darmstadt) (3.2.3) getaucht. Daraufhin erfolgte eine Spülung mit Phosphatpuffer, an die sich eine 15-minütige Gegenfärbung mit 1:20 verdünnter Giemsa-Lösung (Firma Merck Darmstadt) (3.2.3) anschloss. In einem letzten Schritt wurden alle überschüssigen Färbelösungen mittels einer Pufferlösung (3.2.6) ausgewaschen. Nach der Trocknung der Schnitte erfolgten die mikroskopische Untersuchung und die manuelle Differenzierung der Zellen.

Hierfür wurden die Zellpopulationen an Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten bis zu einer Gesamtzellzahl von mindestens 200 Zellen gezählt und anschließend die jeweiligen prozentualen Anteile der einzelnen Zellpopulationen an der ermittelten Gesamtzellzahl berechnet.

Die einzelnen Bestandteile färben sich nach BÖCK (1989) wie folgt an:

Erythrozyten	rosa
Kerne der Leukozyten	rotviolett
Eosinophile Granula	ziegelrot
Basophile Granula	dunkelviolett
Neutrophile Granula	hellviolett
Zytoplasma der Lymphozyten	hellblau
Monozytenplasma	graublau

### **3.3.9 *In-vitro*-Migration der PMN**

#### **Aufbau der Transmigrationskammer**

Die 10-Well-Transmigrationskammer (3.1) besteht aus einer Acrylbodenplatte mit 10 Rundboden-Vertiefungen mit einem Volumen von 415  $\mu\text{l}$  (50 x 101 x 11mm), einer Acryldeckplatte mit korrespondierenden Bohrungen entsprechend der Bodenplatte (50 x 101 x 6 mm), einer Silikondichtungsmatte und sechs Schraubenmuttern. Beim Zusammenbau werden die Boden- und die Deckplatte durch eine zwischengelegte Polycarbonatmembran getrennt, welche den Boden für die Vertiefungen der Deckplatte bildet. Die mit korrespondierenden Löchern ausgestattete Silikonmatte zwischen den beiden Platten dient der Abdichtung. Mit Hilfe der Gewindestangen und Schraubenmuttern werden die beiden Acrylplatten mäßig fest aneinander gepresst. Die Polycarbonatmembran hat eine Größe von 25 x 80 mm und ist 10  $\mu\text{m}$  dick. Die Poren besitzen einen Durchmesser von 3  $\mu\text{m}$ ; damit befinden sich  $2 \times 10^6$  Poren auf einem Quadratzentimeter der Membran.

#### **Testdurchführung**

- Gabe von 315  $\mu\text{l}$  Medium RPMI 1640 (3.2.6) in die Rundboden-Vertiefungen der Acrylbodenplatte (unterer Kammerteil)
- Unterschichtung des Mediums mit 100  $\mu\text{l}$  100 %-tigem isotonem Percoll<sup>®</sup> (3.2.6)
- Beifügung von IL-8 (100 ng/ml) (3.2.6) als chemotaktisches Agens
- Bedeckung des unteren Kammerteils mit einer Polycarbonatmembran
- Legen der Silikondichtung auf die Membran mit Platzierung des oberen Kammerteils und Fixation mittels Schraubenmuttern
- Gabe von 200  $\mu\text{l}$  Zellsuspension ( $2 \times 10^6$  Gesamtleukozyten) in die Bohrungen der Acryldeckplatte (oberer Kammerteil) mit Zusätzen je nach Versuchsaufbau
- Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> über 2 Stunden



- Nach Inkubation Abpipettierung der Zellsuspensionen der oberen Vertiefungen (= nicht gewanderte Zellen), Überführung in Durchflusszytometer-Röhrchen in denen 100 µl Trägerflüssigkeit und 50 µl Referenzzellen vorgelegt waren
- Entfernung der Silikonmatte und Membran
- Durchmischung der Zellsuspension des unteren Kompartiments und anschließend Überführung in Durchflusszytometer-Röhrchen, in denen 100 µl Trägerflüssigkeit und 50 µl Referenzzellen vorgelegt waren

### Auswertung

Zellen aus den oberen und den unteren Kompartimenten wurden durchflusszytometrisch mit der Referenzzellmethode quantifiziert. Aus diesen Werten errechnete sich die Migrationsrate nach folgender Formel:

$$\text{Migrationsrate \%} = \frac{\text{Zellen aus der unteren Kammer}}{\text{Zellen aus der oberen Kammer} + \text{Zellen aus der unteren Kammer}} \times 100$$

#### 3.3.9.1 CXCL-8-induzierte Migration durch *Coffea praeparata* und Koffein *in-vivo*

Um eine Beeinflussung des Migrationsverhaltens der PMN durch *Coffea praeparata* respektive Koffein zu untersuchen, wurde die oben beschriebene Transmigrationskammer verwendet. In den unteren Kompartimenten befand sich CXCL8 (100 ng/ml) oder Medium (RPMI 1640) als Kontrolle der Spontanmigration. Die im Tierversuch gewonnenen, durch Ficoll-Separation separierten, PMN wurden mithilfe der Transmigration (3.3.10) untersucht.

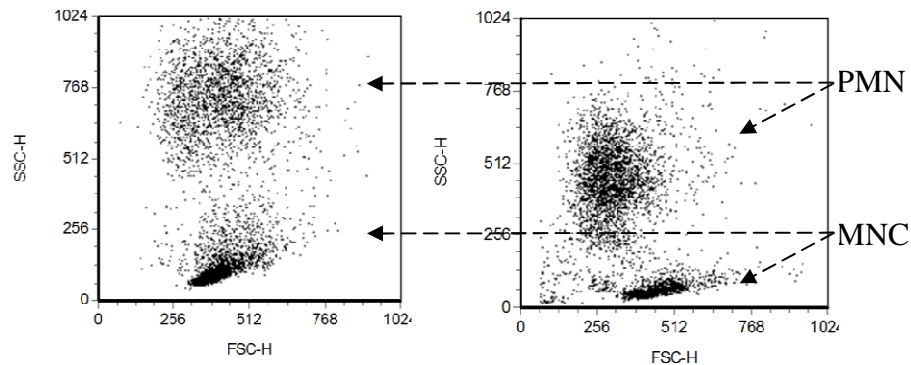
#### 3.3.10 *In-vitro*-Proliferationsmessungen

Mononukleäre Zellen können durch bestimmte Substanzen dazu angeregt werden, sich zu teilen und den zellulären Stoffwechsel zu erhöhen. Proliferierende mononukleäre Zellen nehmen vor der Teilung an Größe zu. Durch die Veränderung im Plasma/Kern-Verhältnis steigert sich die Komplexität der Zellen. Dadurch unterscheiden sich die Blasten bei

durchflusszytometrischer Erfassung von den kleineren, ruhenden Lymphozyten. In dieser Arbeit wurde die morphologische Veränderung der Zellen nach mitogener Stimulation durchflusszytometrisch bestimmt. Um zu prüfen, ob verschiedene Mitogene eine potentiell modulierende Wirkung von *Coffea praeparata* und Koffein anzeigen können, wurden zwei verschiedene Lektine (ConA, Concanavalin A; PHA, Phythemagglutinin) (3.2.3) eingesetzt. Da proliferierende, sich teilende Zellen vor der Teilung an Größe zunehmen und sich durch die Veränderung im Plasma/Kern-Verhältnis auch die Komplexität der Zellen steigert, weisen sie höhere FSC- und SSC-Werte auf (vgl.3.3.6) als ruhende Lymphozyten.

### **Vorversuch**

In mehreren Vorversuchen wurde überprüft, ob eine klare Zelldifferenzierung mittels Durchflusszytometrie im verdünnten Vollblut beim Schwein zu reproduzierbaren Ergebnissen führt. Für die Humanmedizin wurde dieses in Studien bereits bestätigt, wobei sich ein Mischungsverhältnis von 1:10 mit Serum als optimal erwies. (BROMELOW et al. 2001; SVAHN et al. 2003; WENDELBO u. BRUSERUD 2003). Hierzu wurde Vollblut (1:10 mit Medium verdünnt) mit durch Ficoll-Separation (3.3.2) gewonnenen Leukozyten durchflusszytometrisch verglichen.



**Abb. 9** Vergleich leukozytärer Zellpopulationen nach durchflusszytometrischer Erfassung.

Zellen im Vollblut (1:10 in PBS) wurden mit Acridinorange (AO) (3.2.3) gefärbt und mit einem Fenster auf grün fluoreszierende (AO-positive) Zellen im Forward (FSC) gegen *Side-Scater* (SSC) Dotplot erfasst (links). Leukozyten wurden von Erythrozyten mittels hypotoner Lyse separiert und analog gemessen (rechts).

### Durchführung

- Verdünnung der im Tierversuch gewonnenen Blutproben im Verhältnis von 1:10 mit fetalem Kälberserum (3.2.6)
- Verbringung von jeweils 500 µl der Zellsuspension in ein Well einer 48-well-Platte (3.2.2)
- je nach Ansatz Inkubation mit 1 µg/ml PHA, 10 µg/ml ConA oder Medium für die Kontrollgruppe (3.2.3) für 48 Stunden (37°C, 5 % CO<sub>2</sub> in Luft)
- Überführung des Inhaltes eines jeden Wells in ein FACS-Röhrchen und Substitution von 300 µl einer Acridinorange-Ethidiumbromid-Lösung (3.2.6)
- Messung mittels Durchflusszytometrie von jeweils 5000 Zellen je Ansatz
- Setzen eines Gates auf morphologisch identifizierbare Zellen im FSC/SSC dotplot
- Ausschluss von toten Ethidiumbromid-positiven Zellen von der Analyse
- Bestimmung des Verhältnisses von blastisch transformierten Zellen zu nicht transformierten Zellen

Trotz unterschiedlicher Lage in der zweidimensionalen Darstellung lassen sich in beiden Verfahren PMN von MNC eindeutig unterscheiden. Ebenso bleiben die relativen Anteile der Haupt-Zellpopulationen erhalten (Daten nicht gezeigt).

### **3.3.11 Messung der Phagozytosefähigkeit**

Die Phagozytosefähigkeit der Zellen wurde mit dem „Phagotest“-Kit der Firma „Orpegen“ getestet (3.2.3). Dieses Testsystem arbeitet mit Vollblutproben und wird routinemäßig in der Diagnostik angewandt (HIRT et al. 1994). Aus dem Kit stammen alle im Folgenden beschriebenen Reagenzien. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Der Phagotest ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Leukozytenphagozytose in heparinisiertem Vollblut. Das Kit enthält Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte opsonisierte Bakterien (*E. coli*-FITC) und alle notwendige Reagenzien. Es kann der prozentuale Anteil der Monozyten und Granulozyten bestimmt werden, die phagozytieren (Aufnahme von einem oder mehreren Bakterien) und auch deren Phagozytoseaktivität (Anzahl aufgenommener Bakterien pro Zellen und Zeit). Auf diesem Weg wird sowohl eine quantitative als auch qualitative Aussage über die Phagozytose ermöglicht. Es wurde der Einfluss von *Coffea praeparata* auf die Phagozytose im Tierversuch überprüft.

#### **Testdurchführung**

Alle Mischvorgänge fanden auf einem Vortex-Mischer (3.1) statt. 100 µl heparinisieretes Vollblut je Ansatz wurden gemischt und auf den Boden eines 5 ml-Probenröhrchens (3.2.2) aliquotiert. Es sollte darauf geachtet werden, dass kein Blut an den Röhrchenwänden haften bleibt. Die Blutproben mussten vor der Zugabe der Bakterien ca. 10 min. im Eiswasserbad (3.1) inkubiert werden, um sie auf 0°C herunterzukühlen.

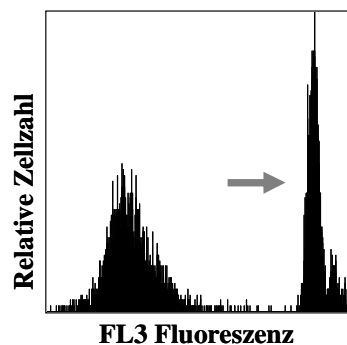
Die vorgekühlten *E. Coli*-Bakterien wurden gut vermengt und pro Ansatz 20 µl zur Vollblutprobe gegeben. Alle Röhrchen wurden nochmals gemischt. Die Röhrchen mit den Kontrollansätzen blieben auf Eis stehen. Die Röhrchen mit den Testansätzen wurden 10 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert, das geschlossen und vorgewärmt sein musste.

Inkubationszeit und Temperatur wurden exakt eingehalten. Die Röhren befanden sich alle in einem Reagenzglasgestell, um einen gleichzeitigen Start und/oder Stopp der Inkubation zu gewährleisten.

Exakt zum Ende der Inkubationszeit wurden alle Proben gleichzeitig zum Abstoppen der Phagozytose aus dem Wasserbad genommen und auf Eis gestellt. Je Ansatz wurden 100 µl eiskalte Quenlösung zugegeben. Alle Proben wurden anschließend gemischt. Je Ansatz wurden direkt im Anschluss 3 ml Waschlösung zugeben und kurz vermengt. Die Röhren wurden für 5 min. bei 250 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert. Die Zellsuspension wurde erneut mit 3 ml Waschlösung 5 min. bei 250 x g und 4°C zentrifugiert. Die Vollblutproben wurden bei Raumtemperatur durch die Zugabe von je 2 ml Lysing solution (vorgewärmt auf Raumtemperatur) lysiert und fixiert. Die Proben wurden nach Zugabe gemischt und anschließend 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für 5 min. bei 250 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Proben wurden anschließend mit 3 ml Waschlösung gewaschen und für 5 min. bei 250 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Zugabe von 200 µl DNA-Färbelösung wurde kurz gemischt und die Proben 10 min. auf Eis inkubiert. Hierbei wurde ein lichtgeschütztes Eiswasserbad benutzt werden. Die Zellsuspension musste innerhalb von 60 min. gemessen werden.

### Durchflusszytometrische Analyse

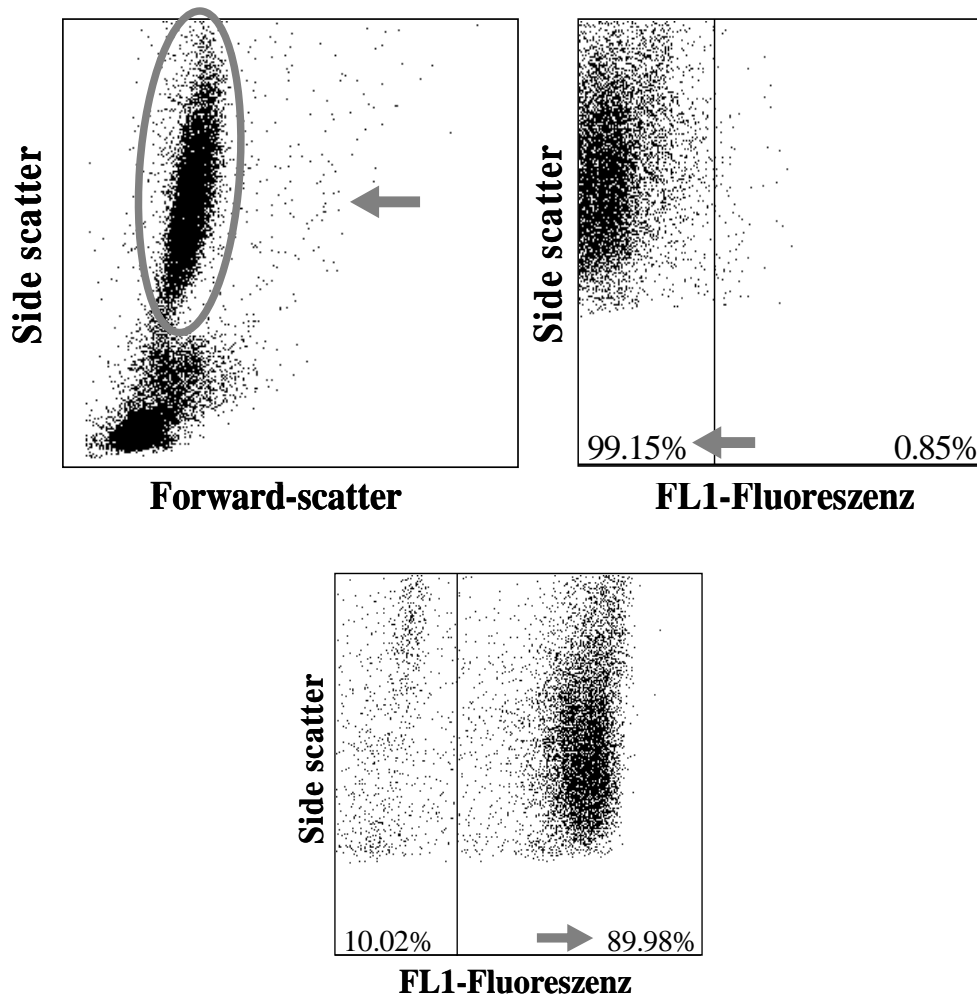
Die Zellen wurden im Durchflusszytometer bei blaugrüner Lichtanregung analysiert (488 nm Argonlaser). Während der Datenaufnahme wurde im Histogramm der Rotfluoreszenz ein *live-gate* auf diejenigen Ergebnisse gesetzt, die mindestens den DNA-Gehalt einer diploiden Zelle besaßen (siehe Abb. 10). Dies diente dem Ausschluss von Bakterienaggregaten. Pro Probe wurden 10-15000 Leukozyten akquiriert.



**Abb. 10** Unterscheidung DNA-haltiger Zellen von Bakterien mittels FACS.

In der FL3-Fluoreszenz wird ein *live-gate* auf alle DNA-haltigen Zellen (Pfeil) gelegt.

Es wurde der prozentuale Anteil an Zellen ausgewertet, die phagozytiert hatten (Monozyten und Granulozyten), und deren mittlere Fluoreszenzintensität (Zahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle). Hierzu wurde die entsprechende Leukozytenpopulation (Abb.11) im Streulichtdiagramm eingegrenzt und anschließend die Grünfluoreszenz im FL1-Histogramm analysiert. Zu diesem Zweck wurde im Grünfluoreszenzhistogramm der 0°C-Kontrolle ein Marker so gesetzt, dass weniger als 1 % der Ergebnisse positiv waren (Abb. 11). Unter Beibehaltung dieser Markerposition wurde im Anschluss in den Testansätzen der Prozentsatz an phagozytierenden Zellen bestimmt. Die mittlere Fluoreszenzintensität entsprach der Anzahl an aufgenommenen Bakterien je Leukozyt.



**Abb. 11** Exemplarische Dot plots FSC/SSC und FL1 des Phagozytostests.

Setzen eines *live-gates* auf PMN (oben rechts), Messung der Negativkontrolle (oben links), Messung der erfolgten Phagozytose (unten). Inkubationszeit von jeweils 10 min bei 37°C.

### 3.3.12 Molekularbiologische Verfahren

Die Methoden der molekularbiologischen Verfahren sind bei Krüger und Sipka ausführlich beschrieben (KRÜGER 2009, SIPKA 2008) und werden der Vollständigkeit halber kurz erläutert.

### 3.3.12.1 Aufbereitung von mRNA aus porzinen Leukozyten für die real time PCR

Aus dem Tierversuch gewonnene, separierte porzine Zellen wurden nach Zentrifugation und Verwerfung des Überstandes im Lyse-Puffer des RNAqueous®-Kit (3.2.3) aufgenommen und gegebenenfalls bis zur weiteren Verarbeitung bei -95°C gelagert. Die im Folgenden genannten Reagenzien stammen aus diesem Kit. Die Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Aufnahme der Zellen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß (3.2.2)
- Zugabe von 500 µl Lyse-Puffer
- mehrmaliges Auf- und Abpipettieren und Überführung des Inhaltes in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß
- Hinzugabe eines äquivalenten Volumens an 64 %igem Ethanol
- Auftragen auf das im Kit enthaltene Filter-System und Zentrifugation für 1 min. bei 16000 x g (3.1).
- Einmaliges Waschen mit 700 µl der Waschlösung # 1 und zweimaliges Waschen mit 500 µl der Waschlösung # 2 durch Gabe über das Filter-System und anschließende Zentrifugation für 1 min. bei 16000 x g
- Einmaliges Leer-Zentrifugieren um ethanolhaltige Rückstände der Waschlösungen vollständig zu entfernen
- Verbringung des Filter-Systems in ein neues 2 ml Sammelröhrchen und Elution der RNA mit 50 µL Elutions-Lösung, (80°C) mit anschließender Zentrifugation für 30 sek. bei 16000 x g
- Wiederholung mit 30 µl Elutions-Lösung und Lagerung auf Eis
- Überprüfung der Reinheit und Konzentration der gewonnenen RNA mittels Eppendorf Biophotometer (3.1) über die Extinktion bei 260 nm und 280 nm
- Verdünnung der Proben auf 1:50 mit TE-Puffer (3.2.6) und Pipettierung in UltraVetten (8,5 mm) (3.2.2)



Die Konzentration (C) in  $\mu\text{g/ml}$  wurde anhand der optischen Dichte bei 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ) nach folgender Formel berechnet:

$$C[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 50$$

Nach der Beurteilung der Reinheit und der Bestimmung der Konzentration wurden die Proben auf 50 ng Gesamt-RNA pro  $\mu\text{l}$  eingestellt. Anschließend wurde die RNA entweder sofort in cDNA umgeschrieben oder bei  $-95^\circ\text{C}$  gelagert.

### **Synthese von cDNA durch reverse Transkription**

In der Reversen-Transkriptase-Reaktion wurde die aus den Zellen gewonnene RNA durch das Enzym Superscript™ II Reverse Transcriptase (3.2.3) in komplementäre cDNA umgeschrieben. Es wurden Oligo-(dt)<sub>12-18</sub>-Primer (3.2.3) verwendet, um die mRNA in cDNA umzuschreiben. Diese lagern sich an das Poly-A-Ende der mRNA Moleküle an und dienen damit als Ausgangsregion für die Reverse Transkriptase.

- Mischen von 10  $\mu\text{l}$  der RNA, 1  $\mu\text{l}$  Oligo-(dt)<sub>12-18</sub>-Primern und 1  $\mu\text{l}$  Trinukleotiden in einem 200  $\mu\text{l}$  Reaktionsgefäß (3.2.2)
- Inkubation für 5 min. bei  $65^\circ\text{C}$  im Biometra T-Gradient (3.1) um die Sekundärstrukturen der RNA aufzufalten
- Lagerung auf Eis und Hinzugabe von jeweils 7  $\mu\text{l}$  des hergestellten Mastermix (Tab. 5)
- Weitere Inkubation bei  $42^\circ\text{C}$  für 2 min.
- Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  (200 U) SuperScript™ II Reverse Transkriptase (3.2.3) mit anschließender Inkubation bei  $42^\circ\text{C}$  für 50 min.
- Durchführung einer Enzym-Denaturierung bei  $70^\circ\text{C}$  für 15 min.

Die auf diesem Wege gewonnene einzelsträngige cDNA konnte für 14 Tage im Kühlschrank oder für mehrere Monate bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

**Tab. 5** Mastermix für die Umschreibung von mRNA in cDNA.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
5 x First-Strand-Buffer (250 mmol/L Tris-HCl, 375 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl <sub>2</sub> )	4,0 µl	
RNase Inhibitor (RNaseOUT™)	1,0 µl	40 IU
Reduktionsmittel (DTT, Dithiothriol)	2,0 µl	0,1 mol/L

### 3.3.12.2 Herstellung externer Standardreihen für die real time PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression durch eine absolute Quantifizierung der in der quantitativen real time PCR gemessenen Produkte vorgenommen. Dazu wurde von jeder Zielsequenz ein externer Standard, ein sogenanntes Messplasmid, hergestellt. Es wurden Genabschnitte der jeweiligen Zielkomponenten mit spezifischen Primern amplifiziert und in einen Vektor kloniert. Mit dem rekombinanten Plasmid wurde ein chemisch kompetenter *E.coli*-Stamm transformiert, in dem das Plasmid vervielfältigt wurde. Nach Extraktion aus den Bakterien wurden Länge und Sequenz des klonierten Genabschnitts verifiziert. Standardreihen der linearisierten Messplasmide wurden parallel zu den Proben in der qPCR gemessen und zur Berechnung der Kopienzahl der jeweiligen Gene herangezogen.

#### 3.3.12.2.2 Gewinnung der Zielsequenzen

Alle für die Klonierung erforderlichen Sequenzen wurden aus cDNA porciner Zellen gewonnen. Nach der Separation von porcinen MNC aus venösem Blut wurden sie kultiviert und durch Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS, 1 µg/ml) und Staphylokokken Enterotoxin A

(SEA, 1 ng/ml) zur Produktion von Zytokinen angeregt. Die RNA der Zellen wurde, wie oben beschrieben, extrahiert und in cDNA umgeschrieben.

### 3.3.12.2.3 Amplifikation der cDNA mittels konventioneller RT-PCR

Die Amplifikation der Zielsequenzen für die nachfolgende Klonierung erfolgte mittels konventioneller PCR in einem Biometra T-Gradient Gerät (3.1).

- Ansetzen von 5 µl cDNA und dem in Tab. 6 dargestellten Mastermix in einem sterilen 200 µl PCR-Röhrchen
- Denaturierung der cDNA für 3 min. bei 94°C
- Durchlaufen von 30 Zyklen aus jeweils einem Denaturierungsschritt für 45 sek. bei 94°C, einer Primer-Anlagerung für 30 sek. bei 58°C und einer Verlängerung des Produkts für 1 min. 30 sek. bei 72°C
- Extension für 10 min. bei 72°C

**Tab. 6** Mastermix für PCR *thermo-cycler* „T-Gradient“.

Reagent	Volumen	Finale Konzentration
10x PCR rxn Buffer without MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	5 µl	1x
10 mmol/l dNTP Mix <sup>1</sup>	1 µl	0.2 mmol/l
50 mmol/l MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	1.5 µl	1.5 mmol/l
Primer Mix (10 µmol/l)	2.5 µl	0.5 µmol/l
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl) <sup>1</sup>	0.25 µl	1 U
RNAse/DNAse-free water <sup>2</sup>	34.75 µl	

Die Substanzen wurden von den Firmen Invitrogen<sup>1</sup> und Sigma Aldrich<sup>2</sup> bezogen.

#### **3.3.12.2.4 Klonierung der Zielsequenz in den Vektor**

In dieser Arbeit wurde das Plasmid pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (3.2.3) mit einer Länge von 3931 Nukleotiden verwendet. Es verfügt sowohl über ein Gen für Ampicillinresistenz als auch über ein lacZ Gen an der Ligationsstelle. Bei der TOPO<sup>®</sup> Cloning Reaktion wurden 3 µl des frischen PCR Produktes, 1 µl Salzlösung und 1 µl Wasser (RNase-/DNase-frei) mit 1 µl TOPO<sup>®</sup> Vektor für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **3.3.12.2.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli***

Unmittelbar anschließend erfolgte die Transformation des Plasmids in chemisch kompetente *E. coli* (non-K-12 Wildtyp, W-Stamm, ATCC # 9637, S.A. Waksman) mittels Hitzeschocktransformation

- Mischen von 2 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl der Bakterien und Inkubation für 30 min. auf Eis
- Öffnung der Zellwand und Aufnahme der Plasmide durch Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden
- Zugabe von 250 µl S.O.C. Medium (3.2.6) und Rütteln der Proben für 1 h auf einem Rüttler bei 37°C und 200 rpm
- Inkubation über Nacht bei 37°C auf einem Ampicillin-haltigen Agar um verbliebene nicht erfolgreich transformierten Bakterien zu hemmen
- Zugabe von x- Gal, einem chromogenen Substrat für β-Galaktosidase (3.2.3), in den Festagar
- Durch Verfärbungen des Agars ermöglichte Vorselektion der gewünschten Bakterienkolonien, anschließende Isolierung und Vermehrung in LB-Flüssigmedium (3.2.6)

### 3.3.12.2.6 Plasmidextraktion, Agarose-Gelelektrophorese und Messplasmid-linearisierung

Die Plasmidextraktion erfolgte mittels des QIAprep® Spin Miniprep Kits nach Herstellerangaben. Mithilfe der Agarosegelelektrophorese (1%-iges Gel) konnte sowohl die Zielsequenzgröße anhand von vorherigem Restriktionsverdau ermittelt werden, als auch die Linearisierung des Messplasmids überprüft werden. Die Linearisierung erfolgte mit den Restriktionsenzymen ScaI oder HindIII, wobei darauf zu achten war, dass die Restriktionsschnittstelle nur einmal im Plasmid und nicht in der Zielsequenz vertreten war. Anschließend erfolgte die Reinigung des Restriktionsansatzes durch das QIAquick® PCR Purification Kits.

### 3.3.12.2.7 Berechnung der Kopienzahl

Die Konzentration (C) der doppelsträngigen Plasmid DNA wurde mittels Eppendorf Biophotometers (3.1) durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) ermittelt und mit der folgenden Formel errechnet.

$$MW = P \times 660 \text{ g/mol}$$

$$S[\text{Kopien}/\mu\text{L}] = \frac{6 \times 10^{23} [\text{Kopien/mol}] \times \text{DNA}[\text{g}/\mu\text{L}]}{\text{MW}[\text{g/mol}]}$$

MW = Molekulargewicht des PCR-Produkts

P = PCR-Produktlänge in Basenpaaren

S = Standardkonzentration

DNA = im Photometer gemessene DNA Konzentration

660 g/mol = Durchschnittliches molekulares Gewicht der Basen

Aus der Stocklösung mit der berechneten Anzahl von Kopien pro  $\mu\text{l}$  wurde im Anschluss eine Verdünnungsreihe hergestellt ( $10^9$  – 100 Kopien/ $\mu\text{L}$ ) und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert

### 3.3.13 Quantitative real time PCR

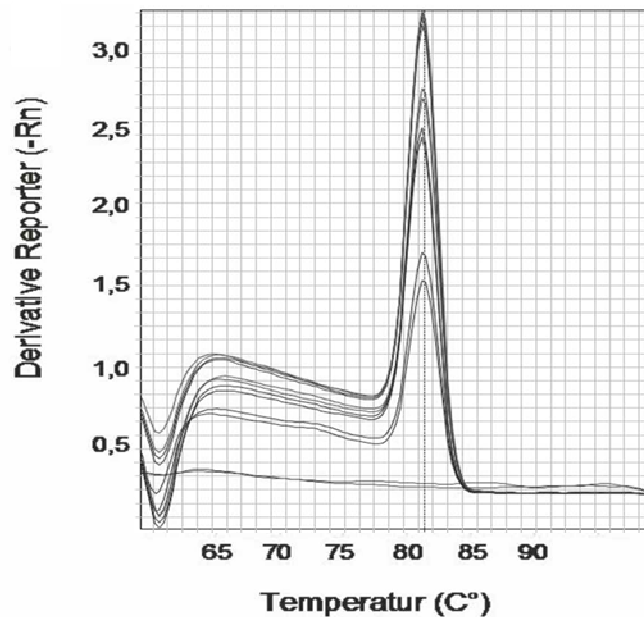
#### Prinzip der qPCR

Bei der qPCR erfolgte die Quantifizierung der PCR-Produkte während der Amplifikationszyklen. Der zugegebene Farbstoff SYBR Green (3.2.3) fluoreszierte nach Anlagerung an doppelsträngige DNA grün. Diese Fluoreszenz steht in einem direkten Verhältnis zur Menge der amplifizierten DNA, eine Aufzeichnung erfolgte über die Software StepOne™ Version 2.0.

Die qPCR setzte sich aus der Wiederholung (Zyklus) dreier Reaktionsschritte zusammen:

- Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA
- Anlagerung der Primer
- Verlängerung des Produkts

Die PCR umfasste 40 bis 50 solcher Zyklen. Je nachdem wie viel Ausgangs-DNA in der Probe enthalten war, steigt die Fluoreszenzintensität ab einem gewissen Moment exponentiell an. Der Moment, wenn das Signal aus dem Hintergrundrauschen heraustritt und somit festgestellt werden kann, wird als Cycle threshold ( $C_t$ ) bezeichnet. An die exponentielle Phase schließt sich eine lineare Phase an, welche durch Inhibition durch Reaktionsprodukte und Enzymlimitierung entsteht. Anschließend folgt die Plateauphase. Da SYBR Green unspezifisch an jede doppelsträngige DNA bindet, musste nach den Amplifikationszyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden (Abb. 12). Dabei werden die Proben schrittweise denaturiert. Abhängig von der Größe der Amplifikationsprodukte zerfallen diese zu einem bestimmten Zeitpunkt, und es findet ein schlagartiger Abfall der Fluoreszenz statt. Befinden sich verschiedene Produkte im Reaktionsansatz, wird dies durch eine mehrgipfelige (mehrere Peaks) Schmelzkurve sichtbar.



**Abb. 12** Schmelzkurve einer qRT-PCR.

Exemplarische Darstellung einer Schmelzkurve von ALOX5 in der ersten negativen Ableitung des Reporter-Farbstoffs SYBR Green (Derivative Reporter(-Rn)) gegen die Temperatur aufgetragen mit einem einheitlichen Peak bei 82,3°C.

### Primeroptimierung

Da die optimale Konzentration von Vorwärts- und Rückwärts-Primern je nach Primer und Gerät unterschiedlich sein konnte, wurden vor jeder Messung für jede Probe die optimalen Primer-Konzentrationen für das zu untersuchende Gen ermittelt. Entsprechend der Matrix aus Tab. 7 wurde für jede Konzentration ein Duplikat aus der Standardreihe (1000 Kopien/ $\mu$ l, Positivkontrolle) und ein Duplikat DNase/RNase-freies Wasser (Negativkontrolle) eingesetzt. Ausgewählt wurde diejenige Kombination von Vorwärts- und Rückwärts-Primer-Konzentration, bei der eine höchstmögliche Sensitivität bei niedriger oder fehlender Amplifikation in der Negativkontrolle vorlag.

**Tab. 7** Matrix für die Primeroptimierung. Kombination der einzelnen Konzentrationen von Vorwärts- und Rückwärts-Primern (nmol/L).

		Rückwärts-Primer (nmol/L)		
		50	300	900
Vorwärts-Primer (nmol/L)	300			
	900			

### Messung der im Tierversuch gewonnenen Proben

In der qRT-PCR wurde die Beeinflussung der Genexpression des Zytokins IL-6 und der Enzyme Prostaglandin-G/H-Synthase- 2 und Lipoxygenase-5 im Blut nach Gabe von *Coffea praeparata* oder physiolog. Kochsalzlösung getestet. Des Weiteren wurde *in vitro* die Beeinflussung der Genexpression des Zytokins TNF- $\alpha$  von Leukozyten (separiert) nach vorheriger Inkubation mit *Coffea praeparata* oder physiologischer Kochsalzlösung analysiert. Für die Durchführung wurde der SYBR Green® PCR Master Mix verwendet. Die Proben wurden wie in 3.3.12.1 beschrieben extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Für jede Messung wurden mindestens fünf Punkte der Standardreihe (100 Kopien–10 Kopien) und eine Negativkontrolle (Mastermix + Wasser) eingesetzt. In eine Micro Amp™ Fast 96-well PCR-Platte wurde pro Vertiefung jeweils 1  $\mu$ l cDNA und 24  $\mu$ l des entsprechenden Mastermix (Tab. siehe unten) pipettiert. Alle Ansätze wurden in Duplikaten angelegt. Zu Beginn der PCR wurden die Proben zur vollständigen Denaturierung der DNA einmalig für 10 Minuten auf 95° C erhitzt. Danach erfolgten 40 Zyklen mit je einer Denaturierung der Proben bei 95°C über 15 Sekunden und der Anlagerung der Primer und der Verlängerung des Produkts bei 60°C über 1 Minute. Nach Ablauf der Amplifikationszyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, was dazu diente die Reinheit des PCR-Produkts anhand von Peaks zu beurteilen. Dabei wurden die Proben von 60°C in Schritten von 0,3°C unter ständiger Aufzeichnung der Fluoreszenz auf 95°C erhitzt.



**Tab. 8** Mastermix für IL-6, Volumen in  $\mu\text{l}$  pro Versuchsansatz.

Reagents	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
SYBR Green <sup>®</sup> PCR master mix	12,5
Water (RNase-, DNase-free)	8,5
Forward primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	1,5
Reverse primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	1,5

**Tab. 9** Mastermix für TNF- $\alpha$ , Volumen in  $\mu\text{l}$  pro Reaktion.

Reagents	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
SYBR Green <sup>®</sup> PCR master mix	12,5
Water (RNase-, DNase-free)	5,5
Forward primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	1,5
Reverse primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	4,5

**Tab. 10** Mastermix für Lipoxxygenase-5, Volumen in  $\mu\text{l}$  pro Reaktion.

Reagents	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
SYBR Green <sup>®</sup> PCR master mix	12,5
Water (RNase-, DNase-free)	6,75
Forward primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	4,5
Reverse primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	0,25

**Tab. 11** Mastermix für Prostaglandin-G/H-Synthase-2, Volumen in  $\mu\text{l}$  pro Reaktion.

Reagens	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
SYBR Green <sup>®</sup> PCR master mix	12.5
Water (RNase-, DNase-free)	5.5
Forward primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	4.5
Reverse primer (5 $\mu\text{mol/L}$ )	1.5

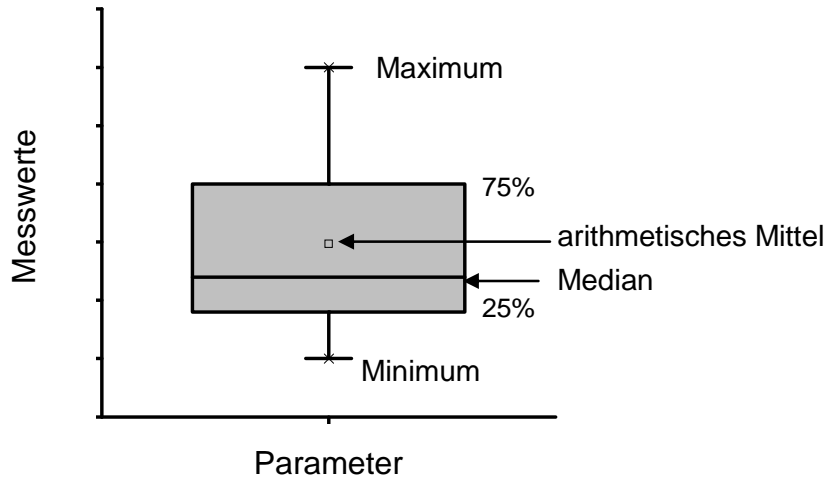
**Auswertung**

Mittels der StepOne<sup>™</sup> Software wurde die Fluoreszenz von SYBR Green aufgezeichnet. Es wurden für jede Probe  $C_t$ -Werte festgelegt. Ebenso wurden diese für die eingesetzten Punkte des externen Standards mit bekannter Kopienzahl bestimmt. Anschließend wurden die ermittelten  $C_t$ -Werte ( $C_i$ ) gegen die Kopienzahl der Standardpunkte ins Verhältnis gesetzt, wodurch eine Standardkurve (Regressionsgerade) entstand. Anhand dieser Kurve konnten die in den Proben enthaltenen Kopienzahlen abgeleitet werden.

Zur Validierung der PCR wurden die Parameter Steigung der Regressionsgraden, Effizienz, Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) und Güte der Schmelzkurve herangezogen.

**3.3.14 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mithilfe des Programms SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary/North Carolina, USA, 1988) und Microcal Origin durchgeführt. In der deskriptiven Statistik wurden die Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Daten wurden durch Mittelwert und Standardfehler beschrieben und dargestellt. Nicht normalverteilte Daten wurden durch Minimal- und Maximalwerte, das obere und untere Quartil sowie den Median charakterisiert und in Boxplots dargestellt. (Abb. 13).



**Abb. 13** Exemplarische Darstellung eines Boxplots.

Exemplarische Darstellung von Messwerten eines Parameters in einem Boxplot. Die zentralen 50 % der Daten befinden sich in der Box, in der der Median durch eine horizontale Linie und der arithmetische Mittelwert durch ein Rechteck gekennzeichnet sind.

Um zu überprüfen, ob sich in voneinander abhängigen Stichproben zwei qualitative Merkmale bezüglich eines quantitativen Merkmals voneinander unterscheiden, wurde bei normalverteilten Daten der gepaarte Student's t-Test angewendet, während bei nicht normalverteilten Daten der Wilcoxon Signed-Rank Test verwendet wurde. Unterschiede zwischen Parameterklassen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) von  $\leq 0,001$  wurden als höchst signifikant, jene mit  $p \leq 0,01$  als hoch signifikant und  $p$ -Werte  $\leq 0,05$  als signifikant bezeichnet. Werte mit  $p > 0,05$  galten als nicht signifikant.

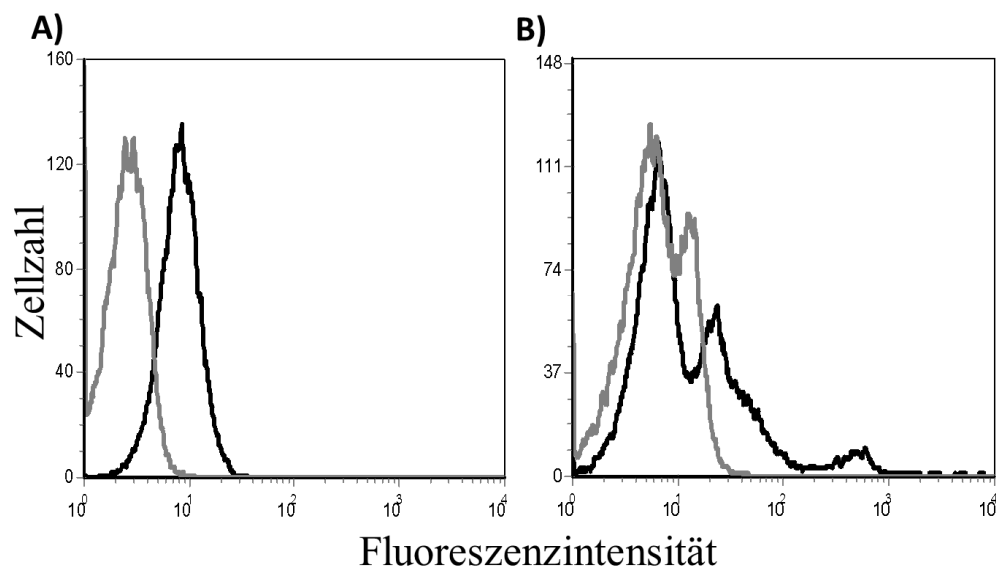
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression des Adenosinrezeptors Typ A2a auf porzinen Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels Membranimmunfluoreszenz (3.3.6) geprüft werden, welche porzinen Immunzellen im Blut den Adenosinrezeptor des Typs A2a exprimieren. Nach Markierung mit einem A2a-spezifischen Antikörper wurden Zellen durchflusszytometrisch charakterisiert.

Sowohl die neutrophilen Granulozyten als auch die mononukleären Zellen erwiesen sich als A2aR-positiv (Abb. 14). Während Neutrophile ein einheitliches Bindungsmuster des A2aR-spezifischen Antikörpers aufwiesen, zeigten MNC eine mehrgipflige Verteilung (Abb. 14).

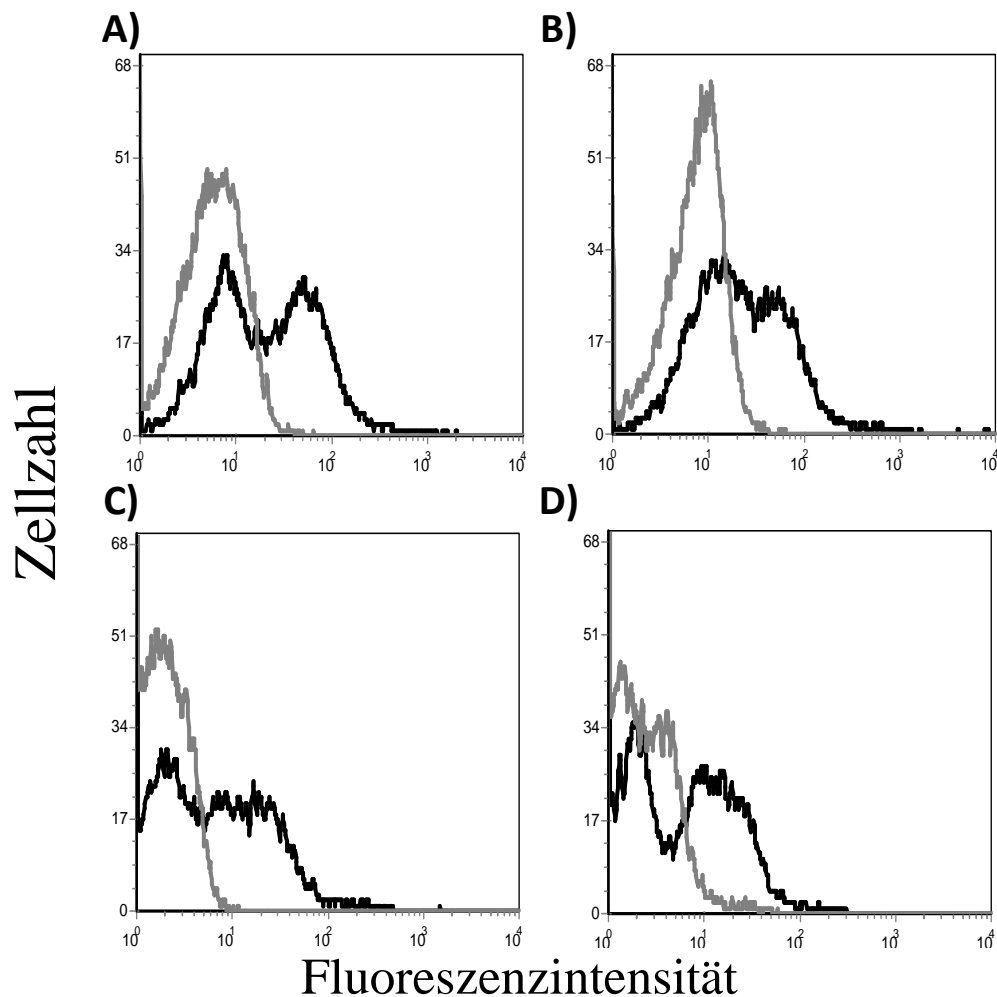
Im Gegensatz hierzu konnten unter den eosinophilen Granulozyten keine A2aR-positiven Zellen dargestellt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 14** Expression von A2a-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten (A) und mononukleären Zellen (B).

Neutrophile Granulozyten und mononukleäre Zellen wurden mit einem A2aR-spezifischen Antikörper markiert und durchflusszytometrisch erfasst. Dargestellt sind die Fluoreszenzhistogramme der Negativkontrolle (kein Antikörper, graue Linie) und des Markierungsansatzes (schwarze Linie).

Zur näheren Analyse des Expressionsmusters unter den MNC wurden Mehrfachfluoreszenzanalysen durchgeführt um die Expression des A2aR unter den Monozyten (CD14+), T-Zellen (CD4+, CD8+)  $\gamma\Delta$ -T-Zellen, und MHC-II+ Zellen zu charakterisieren.

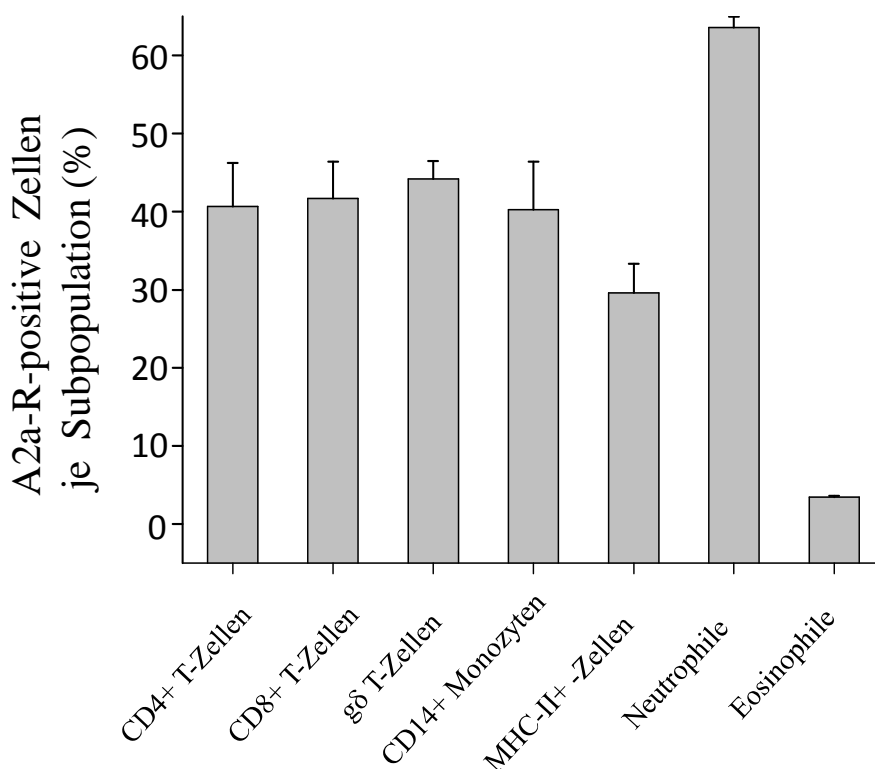


**Abb. 15** Expression von A2a-Rezeptoren auf Subpopulationen mononukleärer Zellen.

Porcine MNC wurden mit zwei Antikörpern doppelt markiert. Der FITC-markierte Antikörper gegen den A2a-Rezeptor wurde in separaten Ansätzen mit PE-markierten Antikörpern gegen CD14 (A), CD4+CD8+ (B),  $\gamma\Delta$ -T (C), oder MHC-II (D) eingesetzt. Nach Setzen eines Fensters auf die zelluläre Subpopulation wurde in Fluoreszenzhistogrammen das A2aR-Emissionsprofil aufgetragen (schwarze Linien). Ansätze ohne Markierung mit dem A2aR-spezifischen Antikörper dienten als Negativkontrolle (graue Linie). Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse für die Zellen eines (von drei geprüften) Tieres.

Unter den untersuchten Subpopulationen, CD14<sup>+</sup> Zellen (Abb.15A), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 15B),  $\gamma\Delta$ T-Zellen (Abb15C) und MHC-II<sup>+</sup> Zellen (Abb15D), erwies sich die Expressionsverteilung des A2a-Rezeptors als dichotom. Somit werden A2aR auf einem Teil der Zellen exprimiert; basierend auf den Fluoreszenzspektren, auf jeweils 30-40% der Zellen einer bestimmten mononukleären Subpopulation. Neutrophile Granulozyten wiesen mit  $63,5\pm 2\%$  den höchsten Anteil an A2aR-positiven Zellen auf. eosinophile Granulozyten konnten mit dem verwendeten A2aR-AK nicht markiert werden.

Unter den positiven Zellen der verschiedenen Subpopulationen erwies sich die relative Expressionsstärke des A2aR vergleichbar (Abb. 16).



**Abb. 16** Anteil A2a-R-positiver Zellen bei leukozytären Subpopulationen.

Nach Doppelmarkierungen mit Subpopulations-spezifischen Antikörpern und einem A2a-R-spezifischen Antikörper wurden die Zellen durchflusszytometrisch erfasst. Nach Setzen eines Gates auf die jeweilige Subpopulation wurde mittels Quadrantenanalyse der Anteil A2a-R-positiver Zellen bestimmt (vgl. Abb. 15); n=3.

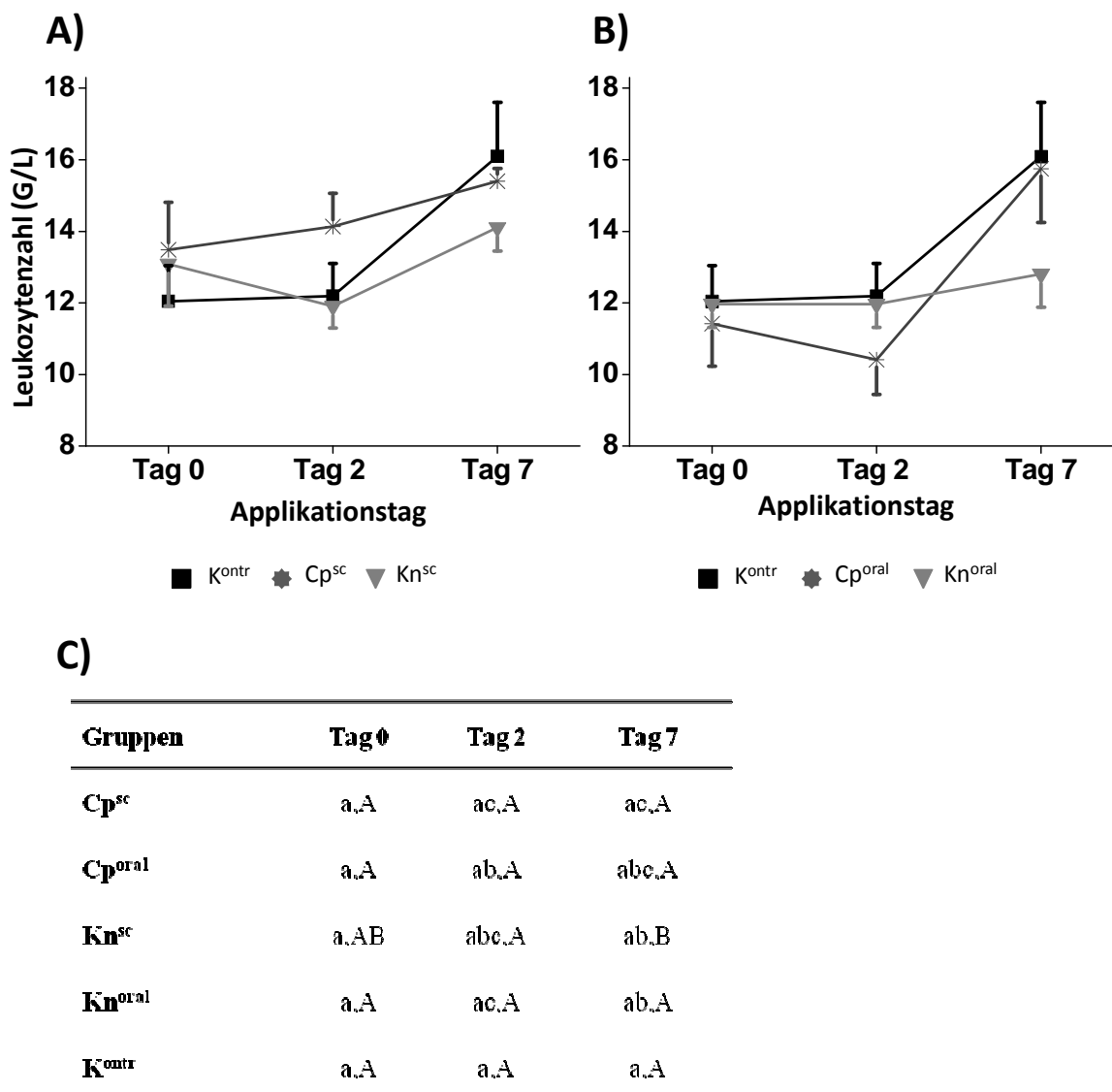
## **4.2 Einfluss von *Coffea praeparata* und Koffein auf das hämatologische Profil porzinen Blutes im Tierversuch**

Um den Einfluss von *Coffea praeparata* und Koffein auf die Zusammensetzung des Blutbildes der Tiere zu untersuchen, wurde jede während des Tierversuches gewonnene Blutprobe mittels automatischer und manueller Zählung differenziert (3.3.8).

### **4.2.1 Einfluss auf die Leukozytenzahl (G/l)**

Die mittlere Zahl der Leukozyten im Blut lag zwischen 10,4 und 15,4 G/l (Abb. 17). Während sich in der Gruppe Cp<sup>oral</sup> ein Anstieg in der Leukozytenzahl sowohl von Tag 0 auf Tag 7 als auch von Tag 2 auf Tag 7 (Abb. 17) als statistisch geringgradig signifikant ( $p < 0,05$ ) zeigte, konnte in der Gruppe Kn<sup>sc</sup> ein statistisch signifikanter Anstieg nur von Tag 2 auf Tag 7 ( $p < 0,05$ ) beobachtet werden (Siehe Abb. 17). In den Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>sc</sup> und Kn<sup>oral</sup> stieg die Zahl der Leukozyten von Tag 0 zu Tag 7 zwar leicht an; dies war allerdings nicht statistisch signifikant (Abb. 17 A,B).

An Tag 2 wies die Gruppe Cp<sup>sc</sup> eine signifikant ( $p < 0,5$ ) ggr. höhere Leukozytenzahl (g/l) auf, als Gruppe Cp<sup>oral</sup> und Kn<sup>oral</sup> (Abb. 17C). Am 7. Tag der Untersuchung wies die Gruppe Cp<sup>sc</sup> eine signifikant ( $p < 0,5$ ) ggr. höhere Leukozytenzahl auf, als die Gruppen Kn<sup>sc</sup> und Kn<sup>oral</sup> (Siehe Abb. 17A,B).



**Abb. 17** Quantifizierung der Leukozyten (G/l) nach *Coffea*- und Koffein-Gabe im Blut.

*Coffea praeparata* (Cp) und Koffein (Kn) wurden je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von jeweils 2 mg/ml auf zwei verschiedenen Wegen (subcutan, 1,5 ml (<sup>sc</sup>) oder per os, 4 ml (<sup>oral</sup>)) appliziert. Als Kontrolle diente physiologische Kochsalzlösung, die subcutan verabreicht wurde (K<sup>ontrolle</sup>, 1,5 ml). Die absoluten Leukozytenzahlen der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>sc</sup> und Kn<sup>sc</sup> (A) und absoluten Leukozytenzahlen der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>oral</sup> und Kn<sup>oral</sup> (B) wurden an Tag 0, 2 und 7 bestimmt. Statistische Signifikanzen dieser Leukozytenzahlen (G/l) finden sich in Tab. C. Die großen Buchstaben stellen den Vergleich innerhalb einer einzelnen Gruppe zwischen den einzelnen Versuchstagen dar, während die kleinen Buchstaben die Vergleiche der einzelnen Gruppen untereinander an einem Versuchstag wiedergeben; n=50, 5 Gruppen á 10 Tiere.



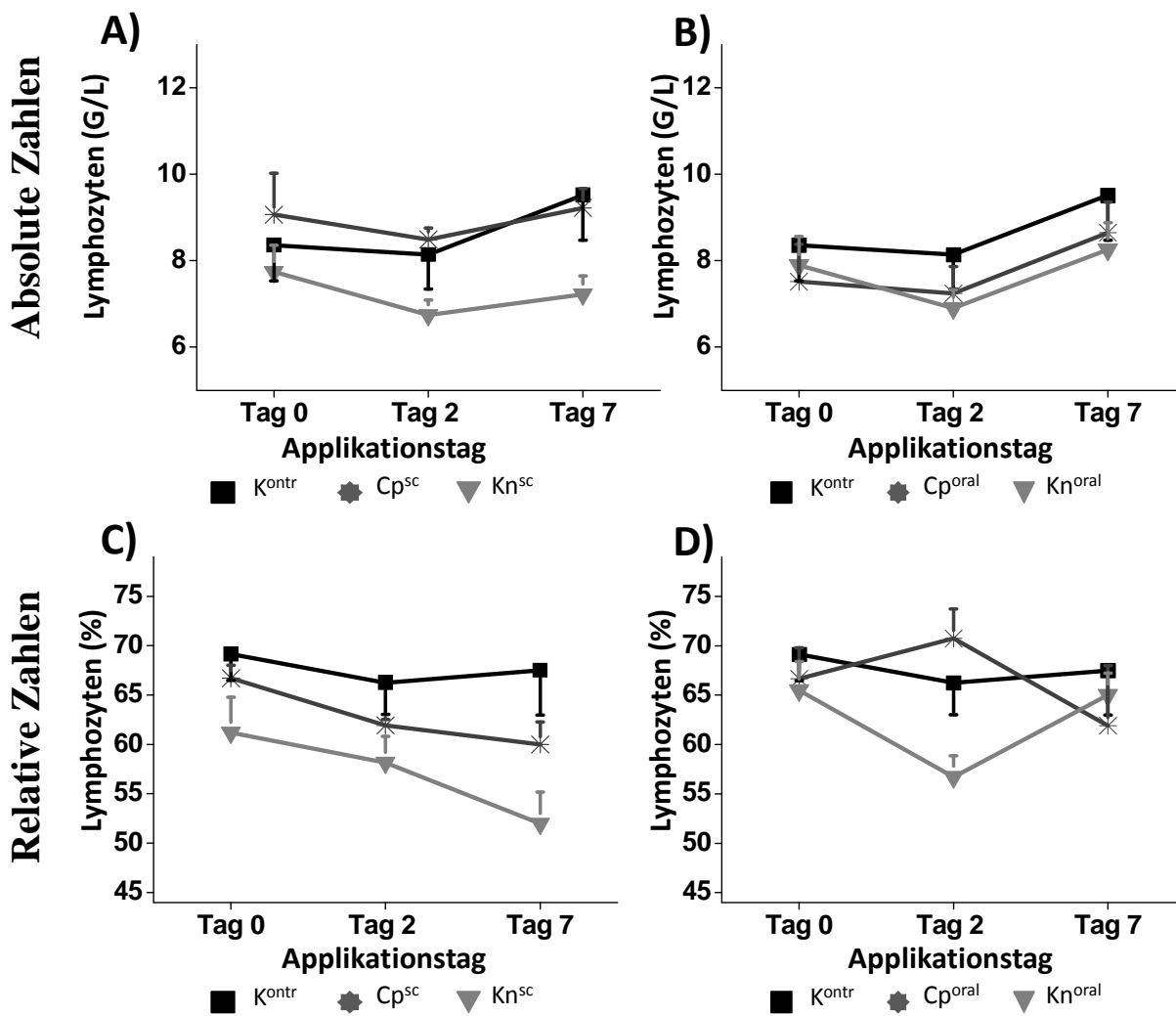
#### **4.2.2 Einfluss auf die absolute und relative Lymphozytenzahl im Blut**

Die mittlere Zahl der Lymphozyten im Blut lag zwischen 6,7 und 9,5 G/l, wobei der mittlere Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten im Blut zwischen 52 und 70,8 % betrug (Abb. 18 A-D).

Die absoluten Lymphozytenzahlen (G/l) unterschieden sich innerhalb der einzelnen Gruppen an den Untersuchungstagen 0, 2 und 7 nicht signifikant voneinander.

Jedoch stellte sich beim Vergleich zwischen den Gruppen Cp<sup>sc</sup> und Kn<sup>sc</sup> am Untersuchungstag 2 und am Tag 7 jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied dar ( $p \leq 0,01$ ) (Abb. 18 E, F). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe K<sup>ontr</sup> ergaben sich keine Unterschiede.

Die relativen Lymphozytenzahlen weisen in der Gruppe Cp<sup>sc</sup> im Verlauf des Versuches einen geringgradigen jedoch signifikanten Abfall auf, währenddessen die Gruppe Kn<sup>oral</sup> nur an Tag 2 einen signifikanten Abfall zeigt. Diese signifikanten Unterschiede bestehen auch im Vergleich zur Kontrollgruppe K<sup>ontr</sup>. Die Gruppe K<sup>sc</sup> stellt sich signifikant geringgradig niedriger als die Kontrollgruppe K<sup>ontr</sup> dar. (Abb. 18 A-D).



**E) Absolute Zahlen**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	a,A	a,A
Cp <sup>oral</sup>	a,A	ac,A	ab,A
Kn <sup>sc</sup>	a,A	bc,A	b,A
Kn <sup>oral</sup>	a,A	c,A	ab,A
K <sup>ontr</sup>	a,A	ac,A	ab,A

**F) Relative Zahlen**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	a,B	a,B
Cp <sup>oral</sup>	a,A	bd,A	abc,A
Kn <sup>sc</sup>	a,A	ac,A	b,A
Kn <sup>oral</sup>	a,A	bc,B	ac,A
K <sup>ontr</sup>	a,A	ad,A	c,A

**Abb. 18** Quantifizierung der absoluten und relativen Lymphozyten nach *Coffea praeparata* und Koffein-Gabe im Blut.

*Coffea praeparata* (Cp) und Koffein (Kn) wurden je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von jeweils 2 mg/ml auf zwei verschiedenen Wegen (subcutan, 1,5 ml (<sup>sc</sup>) oder per os, 4 ml (<sup>oral</sup>)) appliziert. Als Kontrolle diente physiologische Kochsalzlösung, die subcutan verabreicht wurde (K<sup>ontrolle</sup>, 1,5 ml). Die absoluten Lymphozytenzahlen der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>sc</sup> und Kn<sup>sc</sup> (A) und absoluten Lymphozytenzahlen der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>oral</sup> und Kn<sup>oral</sup> (B) wurden an Tag 0, 2 und 7 bestimmt. Die relativen Lymphozytenzahlen finden sich unter C und D. Statistische Signifikanzen der Lymphozytenzahlen (G/l und %) finden sich in Tab. E und F. Die großen Buchstaben stellen den Vergleich innerhalb einer einzelnen Gruppe zwischen den einzelnen Versuchstagen dar, während die kleinen Buchstaben die Vergleiche der einzelnen Gruppen untereinander an einem Versuchstag wiedergeben; n=50, 5 Gruppen á 10 Tiere.

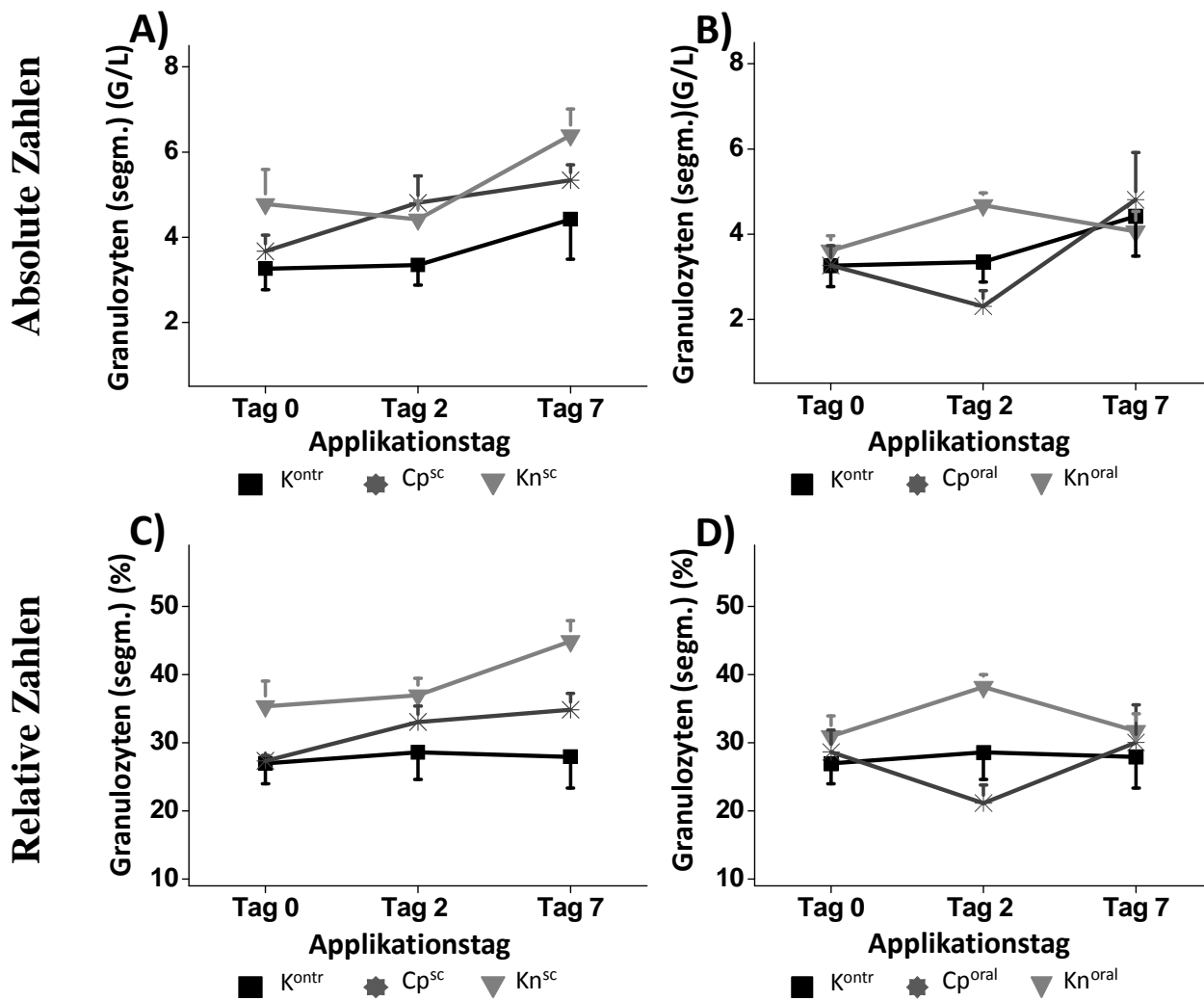
### 4.2.3 Einfluss auf die absolute und relative Anzahl segmentkerniger Granulozyten im Blut

Abbildung 19 kann entnommen werden, dass die mittlere Zahl der segmentkernigen Granulozyten im peripheren Blut zwischen 2,31 und 6,39 G/l lag (A und B) und der mittlere Anteil der segmentkernigen Granulozyten an den Leukozyten im Blut zwischen 21,15 und 44,3 % (C und D) betrug.

Tiere der Gruppen Cp<sup>sc</sup>, Kn<sup>oral</sup> und Kn<sup>sc</sup> reagierten im Verlauf des Versuches mit einem Anstieg der Granulozytenzahlen, welcher bei der Gruppe Cp<sup>sc</sup> im Vergleich zwischen Tag 0 und Tag 7 bei den absoluten wie auch den relativen Zellzahlen, bei der Gruppe Kn<sup>sc</sup> von Tag 2 auf 7 und bei Gruppe Kn<sup>oral</sup> von Tag 0 auf Tag 2 in den absoluten signifikant war ( $p \leq 0,05$ ) (Abb. 19 E;F)

In der Gruppe Cp<sup>oral</sup> fielen die relativen Werte von Tag 0 auf Tag 2 signifikant ab, um von Tag 2 auf Tag 7 signifikant anzusteigen ( $p \leq 0,01$ ) (Abb. 19 D).

Vergleicht man die Applikationsart stellten sich an den Untersuchungstagen signifikante Unterschiede zwischen diesen für *Coffea praeparata* und auch für Koffein dar (siehe Abb. 19 D,E). Die Granulozytenzahlen unterschieden sich jeweils von oraler zu subkutaner Gabe signifikant voneinander. Insgesamt stiegen die Zahl und der Anteil der Granulozyten an den Leukozyten im Verlauf der Applikation in 3 der 4 Wirkstoffgruppen signifikant an, Gruppe Cp<sup>oral</sup> bildet hier eine Ausnahme. Alle 4 Wirkstoffgruppen zeigten eine ggr., jedoch signifikante Erhöhung der Granulozytenwerte im Vergleich zu den Tieren der Gruppe K<sup>ontr</sup>.



**E) Absolute Zahlen**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	a,AB	a,B
Cp <sup>oral</sup>	a,AB	b,A	ab,B
Kn <sup>sc</sup>	a,AB	a,A	a,B
Kn <sup>oral</sup>	a,A	a,B	b,AB
K <sup>ontr</sup>	a,A	ab,A	b,A

**F) Relative Zahlen**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	a,B	a,B
Cp <sup>oral</sup>	ac,A	bc,A	ac,A
Kn <sup>sc</sup>	bc,A	a,A	b,A
Kn <sup>oral</sup>	ac,A	a,A	ac,A
K <sup>ontr</sup>	ac,A	ac,A	c,A

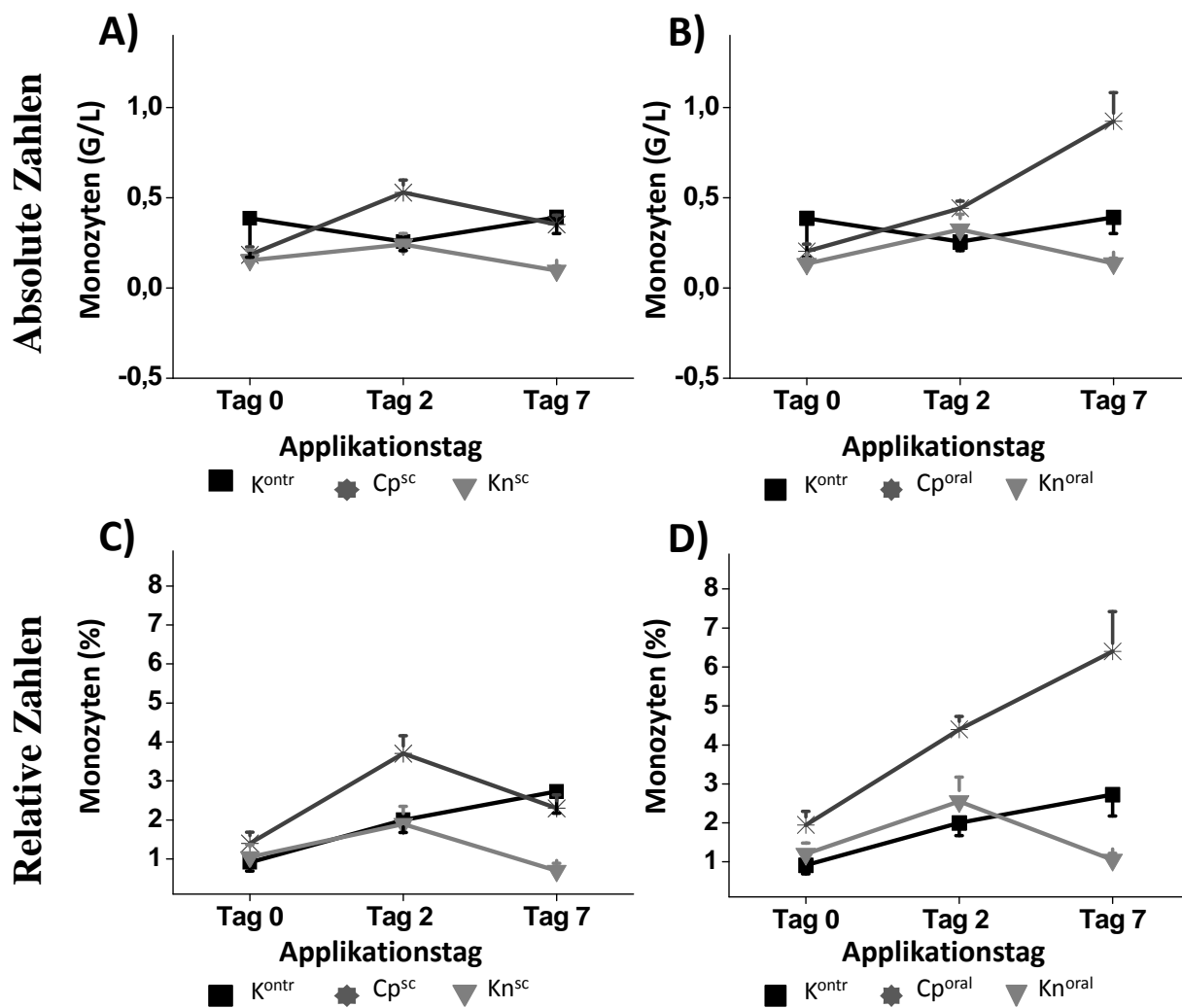
**Abb. 19** Beeinflussung der Granulozytenzahlen nach *Coffea praeparata* und Koffein-Gabe im Blut.

*Coffea praeparata* (Cp) und Koffein (Kn) wurden je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von jeweils 2 mg/ml auf zwei verschiedenen Wegen (subcutan, 1,5 ml (<sup>sc</sup>) oder per os, 4 ml (<sup>oral</sup>)) appliziert. Als Kontrolle diente physiologische Kochsalzlösung, die subcutan verabreicht wurde ( $K^{\text{kontrolle}}$ , 1,5 ml). Die absoluten Granulozytenzahlen der Gruppen  $K^{\text{ontr}}$ ,  $Cp^{\text{sc}}$  und  $Kn^{\text{sc}}$  (A) und absoluten Granulozytenzahlen der Gruppen  $K^{\text{ontr}}$ ,  $Cp^{\text{oral}}$  und  $Kn^{\text{oral}}$  (B) wurden an Tag 0, 2 und 7 bestimmt. Die relativen Granulozytenzahlen finden sich unter C und D. Statistische Signifikanzen der Granulozytenzahlen (G/l und %) finden sich in Tab. E und F. Die großen Buchstaben stellen den Vergleich innerhalb einer einzelnen Gruppe zwischen den einzelnen Versuchstagen dar, während die kleinen Buchstaben die Vergleiche der einzelnen Gruppen untereinander an einem Versuchstag wiedergeben; n=50, 5 Gruppen á 10 Tiere.

#### 4.2.4 Einfluss auf die Monozyten-Anzahl im Blut (G/l)

Die mittlere Zahl der Monozyten im Blut lag zwischen 0,1 und 0,95 G/l, der mittlere Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten im Blut lag zwischen 1 und 6% (siehe Abb. 20 A-D)

Die Gruppe  $Cp^{\text{oral}}$  zeigte im Verlauf der Untersuchung einen statistisch höchstsignifikanten Anstieg der Monozytenzahlen von Tag 0 über Tag 2 ( $p \leq 0,001$ ) auf Tag 7 ( $p \leq 0,01$ ). Von Tag 0 zu Tag 7 im direkten Vergleich zeigte sich so höchstsignifikante Erhöhung der Monozytenzahlen ( $p \leq 0,001$ ). Dies trifft sowohl für die absoluten wie auch für die relativen Zellzahlen zu (Abb. 20E,F). Die Gruppen  $Cp^{\text{sc}}$  und  $Kn^{\text{oral}}$  zeigte im Verlauf des Versuches einen signifikanten Anstieg der Monozyten von Tag 0 auf Tag 2 ( $p \leq 0,01$ ), gefolgt von einem ggr. aber signifikanten Rückgang am Tag 7 ( $p \leq 0,01$ ), dies ebenfalls wieder zutreffend für die absoluten, wie auch die relativen Werte. Beim Vergleich der absoluten Monozytenzahl (G/l) stellten sich bei Tieren der Gruppe  $K^{\text{ontr}}$  untereinander keine signifikanten Unterschiede an den 3 Tagen der Untersuchung dar. Im Vergleich der Gruppen untereinander waren signifikante Unterschieden insbesondere der Gruppe  $Cp^{\text{oral}}$  zu den übrigen Gruppen festzustellen (siehe Abb. 20 A-F).



**E) Absolute Zahlen**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	a,B	a,B
Cp <sup>oral</sup>	a,A	a,B	b,C
Kn <sup>sc</sup>	a,AB	b,A	c,B
Kn <sup>oral</sup>	a,A	ab,A	c,A
K <sup>ontr</sup>	a,A	b,A	a,A

**F) Relative Zahlen**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	ac,B	a,C
Cp <sup>oral</sup>	a,A	a,B	b,B
Kn <sup>sc</sup>	a,AB	b,A	cd,B
Kn <sup>oral</sup>	a,AB	abc,A	b,B
K <sup>ontr</sup>	a,A	b,B	a,B

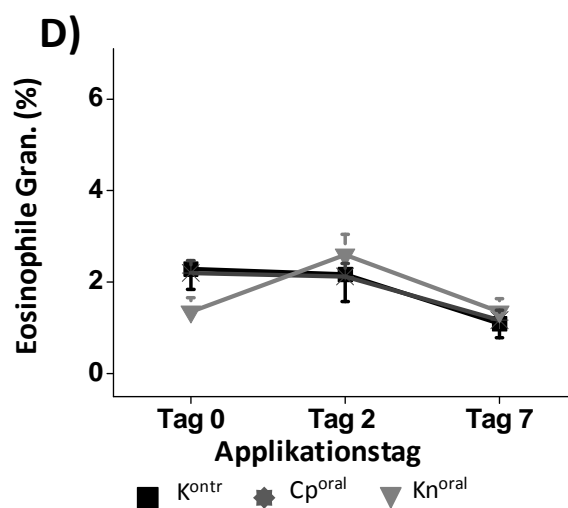
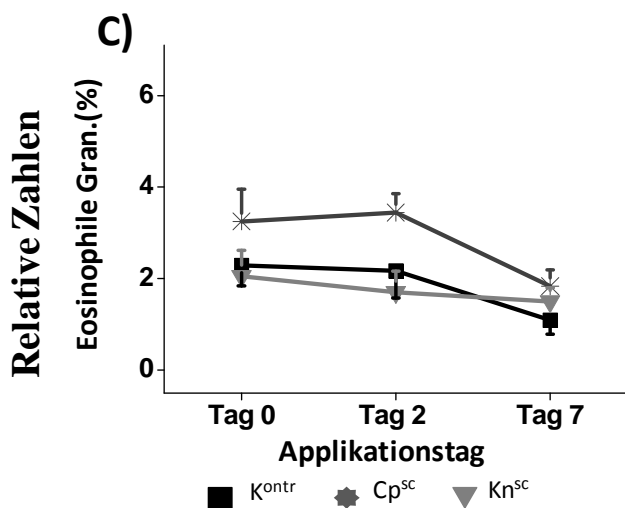
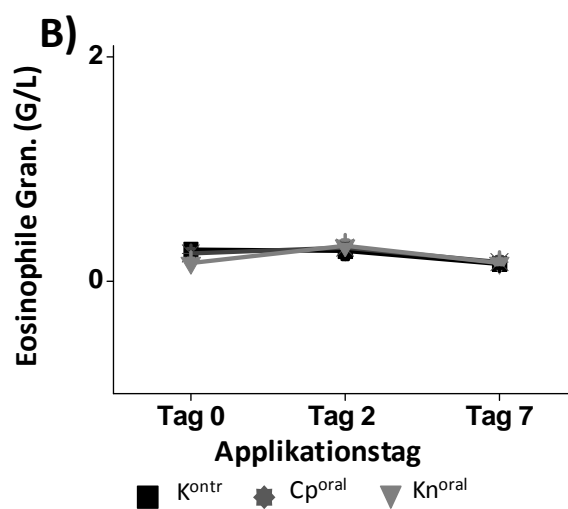
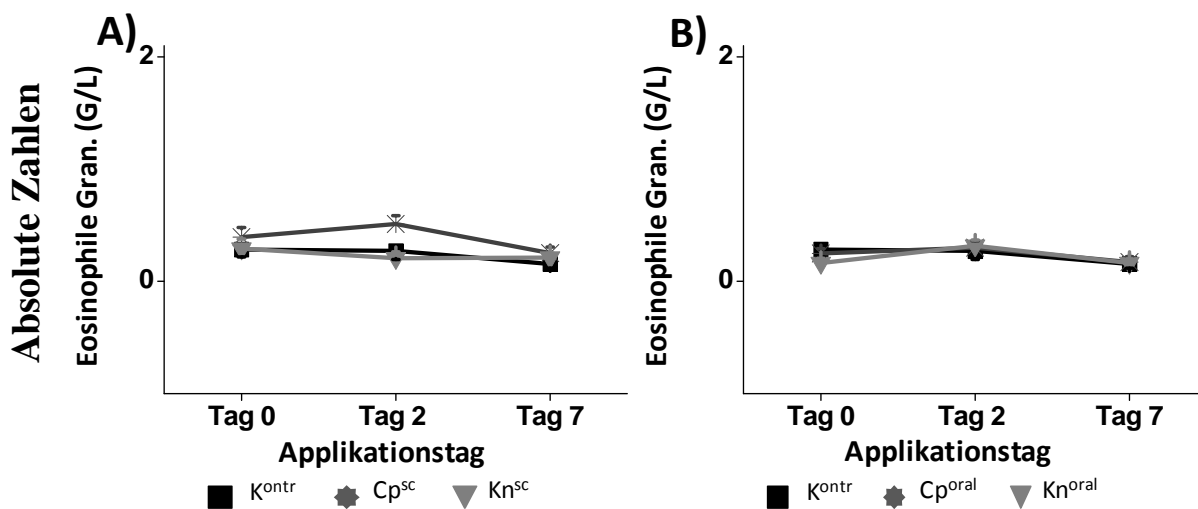
**Abb. 20** Beeinflussung der Monozytenzahlen nach *Coffea praeparata* und Koffein-Gabe im Blut.

*Coffea praeparata* (Cp) und Koffein (Kn) wurden je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von jeweils 2 mg/ml auf zwei verschiedenen Wegen (subcutan, 1,5 ml (<sup>sc</sup>) oder per os, 4 ml (<sup>oral</sup>)) appliziert. Als Kontrolle diente physiologische Kochsalzlösung, die subcutan verabreicht wurde (K<sup>ontrolle</sup>, 1,5 ml). Die absoluten Monozytenzahlen der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>sc</sup> und Kn<sup>sc</sup> (A) und absoluten Monozytenzahlen der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>oral</sup> und Kn<sup>oral</sup> (B) wurden an Tag 0, 2 und 7 bestimmt. Die relativen Monozytenzahlen finden sich unter C und D. Statistische Signifikanzen der Monozytenzahlen (G/l und %) finden sich in Tab. E und F. Die großen Buchstaben stellen den Vergleich innerhalb einer einzelnen Gruppe zwischen den einzelnen Versuchstagen dar, während die kleinen Buchstaben die Vergleiche der einzelnen Gruppen untereinander an einem Versuchstag wiedergeben; n=50, 5 Gruppen á 10 Tiere.

#### **4.2.5 Einfluss auf die absolute und relative Anzahl eosinophiler Granulozyten**

Bei den Blutuntersuchungen wurden keine signifikanten Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Tiergruppen als auch innerhalb der Tiergruppen zu den verschiedenen Zeiträumen bei der absoluten Zahl der Eosinophilen Granulozyten festgestellt (Abb. 21 A, B, E).

In Bezug auf die relative Zellzahl weisen die beiden Gruppen Cp<sup>oral</sup> und Cp<sup>sc</sup> am Tag 7 einen signifikanten Abfall auf, Cp<sup>oral</sup> von 2,1% am Tag 2 auf 1,2% am Tag 7 ( $p \leq 0,05$ ) bei nahezu gleicher absoluter Zellzahl (G/l) auf (Abb. 21 C, D, E). Vergleicht man die einzelnen Gruppen untereinander, so kommt es an Tag 2 zu geringgradigen aber signifikanten Unterschieden in den Gruppen Cp<sup>oral</sup>, Cp<sup>sc</sup> und Kn<sup>sc</sup> (Abb. 21 F).



**E) Absolute Zahlen**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	a,A	a,A
Cp <sup>oral</sup>	a,A	a,A	a,A
Kn <sup>sc</sup>	a,A	a,A	a,A
Kn <sup>oral</sup>	a,A	a,A	a,A
K <sup>kontr</sup>	a,A	a,A	a,A

**F) Relative Zahlen**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,AB	b,A	a,B
Cp <sup>oral</sup>	a,A	a,A	a,B
Kn <sup>sc</sup>	a,A	a,A	a,A
Kn <sup>oral</sup>	a,A	ab,A	a,A
K <sup>kontr</sup>	a,A	ab,A	a,A

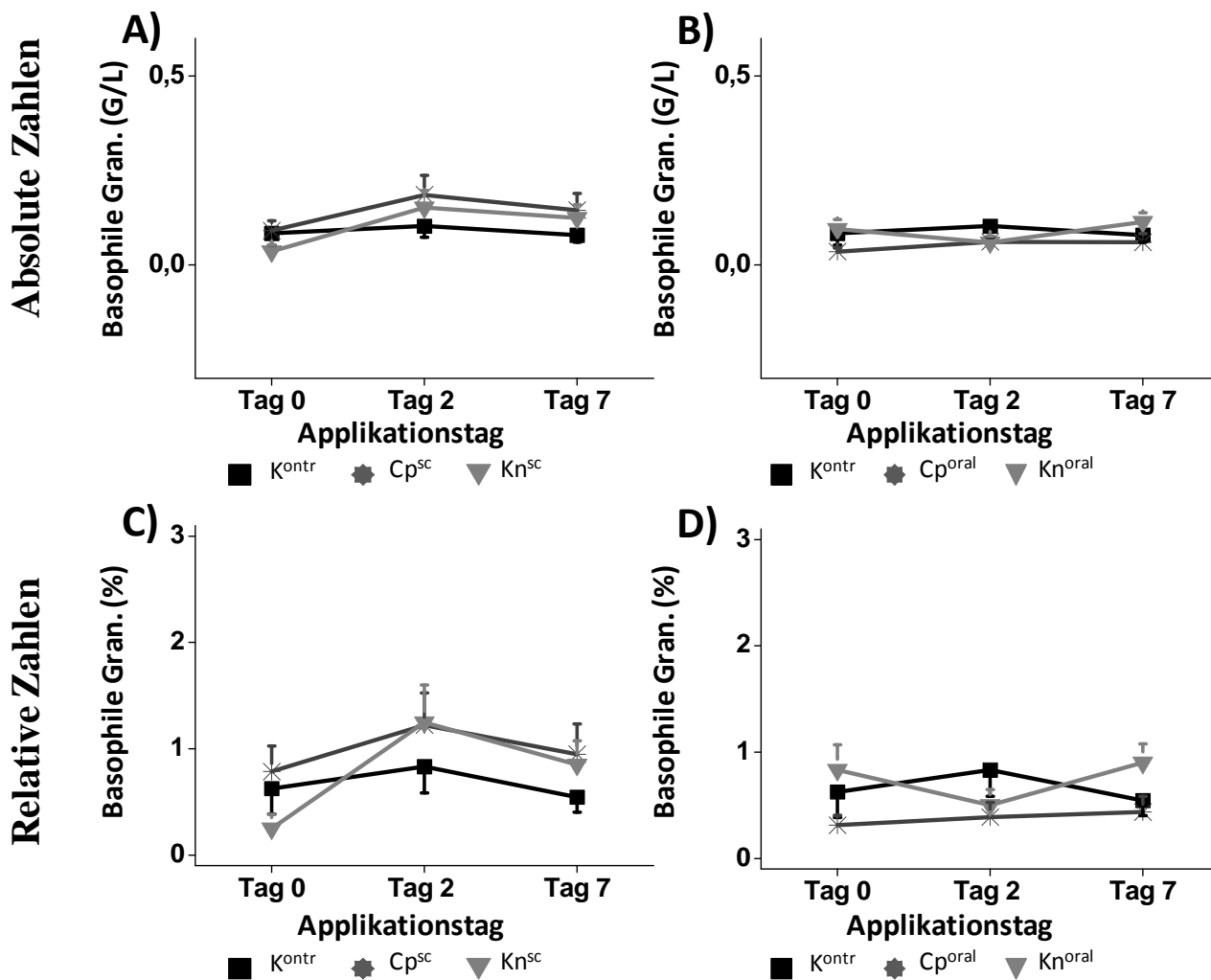


**Abb. 21** Beeinflussung der Eosinophilenzahl nach *Coffea praeparata* und Koffein-Gabe im Blut.

*Coffea praeparata* (Cp) und Koffein (Kn) wurden je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von jeweils 2 mg/ml auf zwei verschiedenen Wegen (subcutan, 1,5 ml (<sup>sc</sup>) oder per os, 4 ml (<sup>oral</sup>)) appliziert. Als Kontrolle diente physiologische Kochsalzlösung, die subcutan verabreicht wurde (K<sup>ontrolle</sup>, 1,5 ml). Die absoluten Eosinophilenzahlen der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>sc</sup> und Kn<sup>sc</sup> (A) und absoluten Eosinophilenzahlen der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>oral</sup> und Kn<sup>oral</sup> (B) wurden an Tag 0, 2 und 7 bestimmt. Die relativen Eosinophilenzahlen finden sich unter C und D. Statistische Signifikanzen der Eosinophilenzahlen (G/l und %) finden sich in Tab. E und F. Die großen Buchstaben stellen den Vergleich innerhalb einer einzelnen Gruppe zwischen den einzelnen Versuchstagen dar, während die kleinen Buchstaben die Vergleiche der einzelnen Gruppen untereinander an einem Versuchstag wiedergeben; n=50, 5 Gruppen á 10 Tiere.

#### **4.2.6 Einfluss auf die Anzahl basophiler Granulozyten im Blut**

Bei den Blutuntersuchungen wurden weder zwischen den einzelnen Tiergruppen noch innerhalb der Tiergruppen zu den verschiedenen Zeiträumen signifikanten Unterschiede festgestellt. Dies gilt sowohl für die absolute Anzahl als auch den prozentualen Anteilen der basophilen Granulozyten im peripheren Blut (Abb. 22).



**E) Absolute Zahlen**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	a,A	a,A
Cp <sup>oral</sup>	a,A	a,A	a,A
Kn <sup>sc</sup>	a,A	a,A	a,A
Kn <sup>oral</sup>	a,A	a,A	a,A
K <sup>ontr</sup>	a,A	a,A	a,A

**F) Relative Zahlen**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	a,A	a,A
Cp <sup>oral</sup>	a,A	a,A	a,A
Kn <sup>sc</sup>	a,A	a,A	a,A
Kn <sup>oral</sup>	a,A	a,A	a,A
K <sup>ontr</sup>	a,A	a,A	a,A

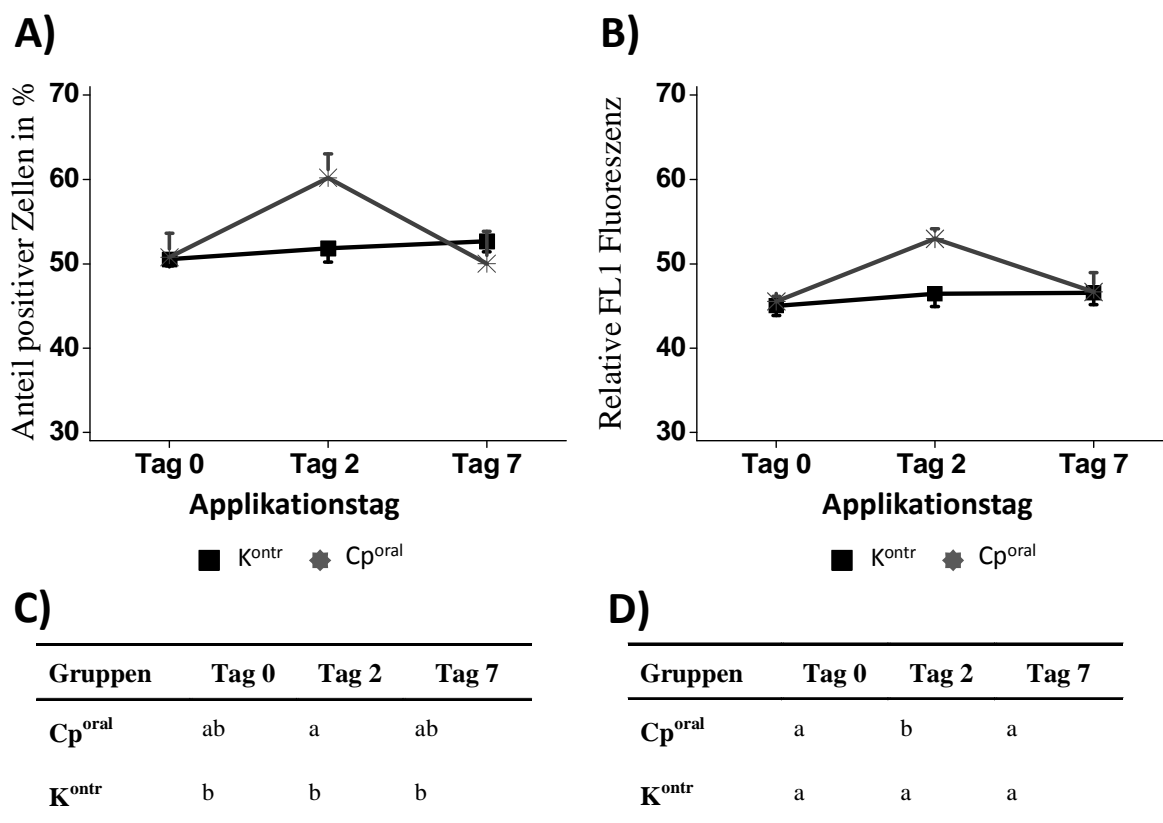
**Abb. 22** Beeinflussung der basophilen Granulozytenzahl nach *Coffea praeparata* und Koffein-Gabe im Blut.

*Coffea praeparata* (Cp) und Koffein (Kn) wurden je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von jeweils 2 mg/ml auf zwei verschiedenen Wegen (subcutan, 1,5 ml (<sup>sc</sup>) oder per os, 4 ml (<sup>oral</sup>)) appliziert. Als Kontrolle diente physiologische Kochsalzlösung, die subcutan verabreicht wurde (K<sup>ontrolle</sup>, 1,5 ml). Die absoluten Basophilenzahlen der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>sc</sup> und Kn<sup>sc</sup> (A) und absoluten Basophilenzahlen der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>oral</sup> und Kn<sup>oral</sup> (B) wurden an Tag 0, 2 und 7 bestimmt. Die relativen Basophilenzahlen finden sich unter C und D. Statistische Signifikanzen der Basophilenzahlen (G/l und %) finden sich in Tab. E und F. Die großen Buchstaben stellen den Vergleich innerhalb einer einzelnen Gruppe zwischen den einzelnen Versuchstagen dar, während die kleinen Buchstaben die Vergleiche der einzelnen Gruppen untereinander an einem Versuchstag wiedergeben; n=50, 5 Gruppen á 10 Tiere.

### **4.3 Einfluss von *Coffea praeparata* auf die Expression von L-Selektinen *ex vivo***

Im Folgenden wurde untersucht, ob *Coffea praeparata* bei oraler Applikation (Gruppe Cp<sup>oral</sup>) einen Einfluss auf die Expression von L-Selektin auf MNC und PMN nimmt (3.3.6).

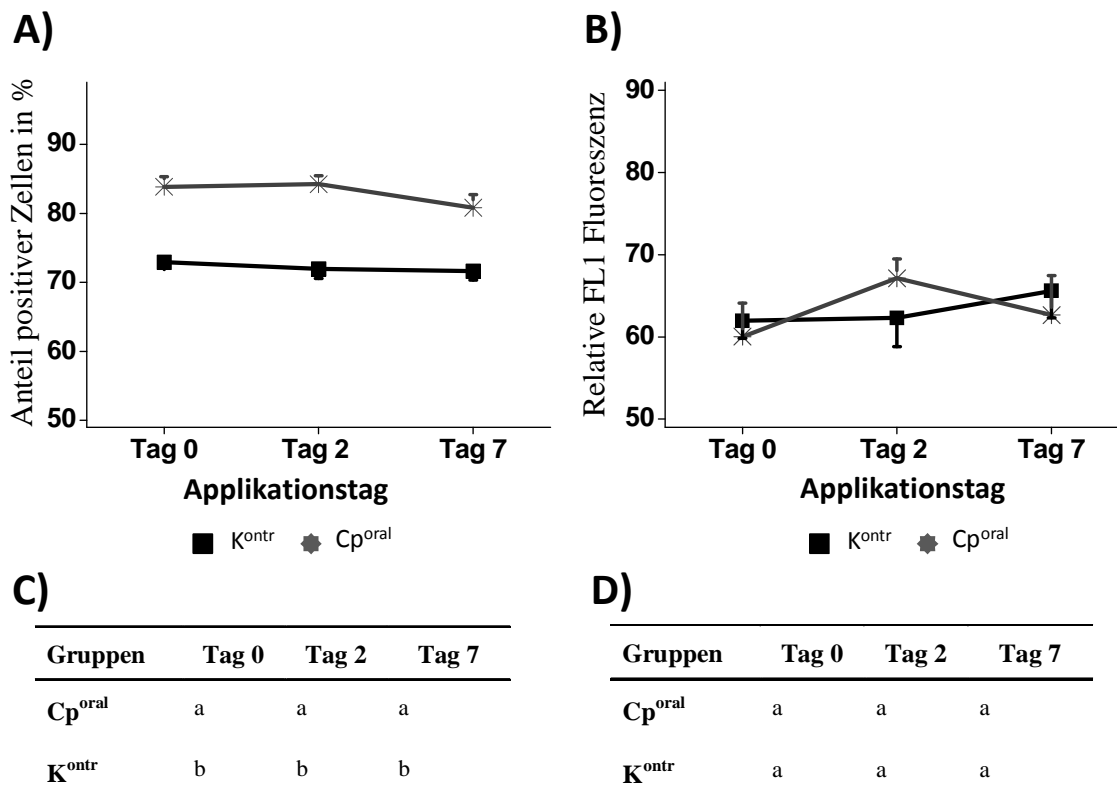
Der Prozentsatz L-Selektin-positiver MNC (52±2 %) und die mittlere Fluoreszenzintensität positiver Zellen der Gruppe K<sup>ontr</sup> war zu keinem der drei Zeitpunkte signifikant unterschiedlich (Abb. 23 A,B). In der Gruppe Cp<sup>oral</sup> stieg die mittlere Fluoreszenzintensität an Tag 2 nach oraler Gabe signifikant an, um an Tag 7 nach Applikation wieder auf das Ausgangsniveau zu fallen. Tiere der Gruppe Cp<sup>oral</sup> unterschieden sich bezüglich der mittleren Fluoreszenzintensität und des Anteils L-Selektin-positiver MNC an Tag 2 nach oraler Gabe signifikant von den Kontrolltieren (Abb. 23).



**Abb. 23** Quantifizierung der L-Selektin-Expression von MNC nach oraler Applikation von *Coffea praeparata*.

Tieren der Gruppe Cp<sup>oral</sup> (n=10) wurde *Coffea praeparata* per os (4 ml) je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von 2 mg/ml Koffein appliziert, während Kontrolltiere (K<sup>ontr</sup>, n=10) physiologische NaCl-Lösung (per os 4 ml) erhielten. Blut-MNC wurden an Tag 0, 2 und 7 gewonnen und nach Anfärben mit einem L-Selektin-spezifischen Antikörper durchflusszytometrisch auf den Anteil positiver Zellen (A) und auf die mittlere Fluoreszenzintensität positiver Zellen (B) geprüft. Statistische Vergleiche zwischen den Tagen und den Gruppen finden sich für A) und B) unter der Abbildung (C und D). Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede (p<0,05); n=20, 2 Gruppen á 10 Tiere.

Der Prozentsatz L-Selektin-positiver PMN beider Gruppen (Cp<sup>oral</sup> und K<sup>ontr</sup>) blieb im Laufe des Versuches konstant. Jedoch lag der Prozentsatz bei der Gruppe Cp<sup>oral</sup> während des gesamten Verlaufes signifikant auf einem höheren Niveau als die Kontrollgruppe (Abb. 24 A). In Bezug auf die Fluoreszenzintensität beider Gruppen zeigten sich keine Beeinflussungen. Beide Gruppen wiesen vergleichbare Werte auf (Abb. 24B,D).



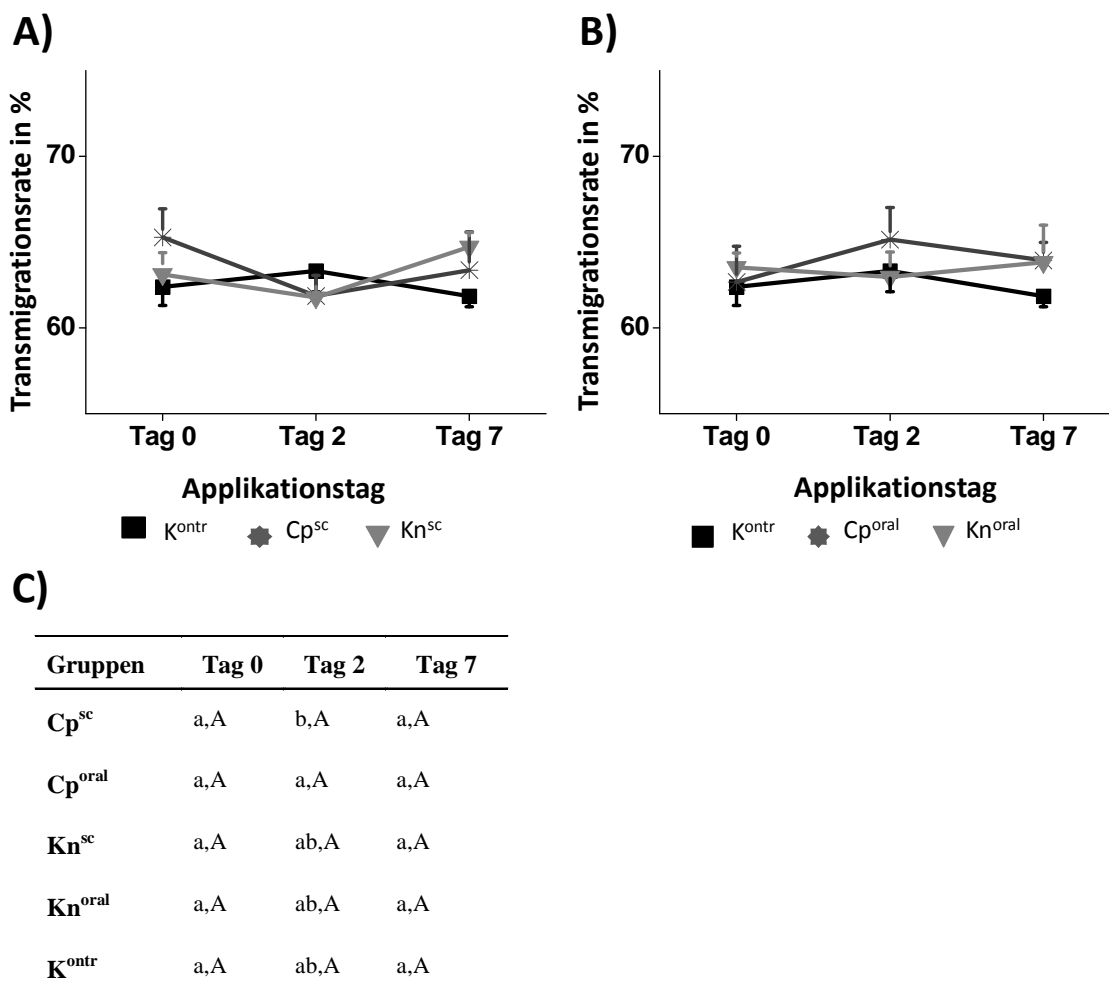
**Abb. 24** Quantifizierung der L-Selektin-Expression von PMN nach oraler Applikation von *Coffea praeparata*.

Tieren der Gruppe Cp<sup>oral</sup> (n=10) wurde *Coffea praeparata* per os (4 ml) je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von 2 mg/ml Koffein appliziert, während Kontrolltiere (K<sup>ontr</sup>, n=10) physiologische NaCl-Lösung (per os 4 ml) erhielten. Blut- PMN wurden an Tag 0, 2 und 7 gewonnen und nach Anfärben mit einem L-Selektin-spezifischen Antikörper durchflusszytometrisch auf den Anteil positiver Zellen (A) und auf die mittlere Fluoreszenzintensität positiver Zellen (B) geprüft. Statistische Vergleiche zwischen den Tagen und den Gruppen finden sich für A) und B) unter der Abbildung (C und D). Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede (p<0,05); n=20, 2 Gruppen á 10 Tiere.

#### **4.4 Einfluss von *Coffea praeparata* und Koffein auf die Migrationsfähigkeit von PMN**

Im Folgenden wurde untersucht, ob *Coffea praeparata* Einfluss auf die Transmigrationsrate von porzinen PMN's hatte. Das Blut der einzelnen Tiergruppen wurde separiert und für 2 Stunden in die Transmigrationskammer verbracht (siehe 3.3.9).

Weder die PMN innerhalb der Tiergruppen noch diese gruppenübergreifend verglichen wiesen signifikant unterschiedlichen Migrationsraten in den *In vitro*-Transmigrationsversuchen auf. Mit Ausnahme einer ggr. signifikant unterschiedlichen Migrationsrate an Tag 2 zwischen den Gruppen Cp<sup>sc</sup> (61,86 %) und Cp<sup>oral</sup> (65,18 %) unterschieden sich die Raten ebenfalls nicht im Vergleich zwischen den Gruppen an den verschiedenen Tagen nach einer ein- oder mehrfachen Applikation von *Coffea praeparata* und Koffein, was überdies auch unabhängig von der Applikationsform war (Abb. 25).



**Abb. 25** Beeinflussung der CXCL8-induzierten Transmigrationsrate von PMN durch *Coffea praeparata* und Koffein.

*Coffea praeparata* (Cp) und Koffein (Kn) wurden je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von jeweils 2 mg/ml auf zwei verschiedenen Wegen (subcutan, 1,5 ml (<sup>sc</sup>) oder per os, 4 ml (<sup>oral</sup>)) appliziert. Als Kontrolle diente physiologische Kochsalzlösung, die subcutan verabreicht wurde (K<sup>ontrolle</sup>, 1,5 ml). PMN wurden nach Blutentnahme und Separation an Tag 0, 2 und 7 in die obere Bucht der Transmigrationskammer verbracht. Die unteren Vertiefungen enthielten Medium mit CXCL8 in einer Konzentration von 100 ng/ml. Die Zellen verblieben für der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>sc</sup> und K<sup>sc</sup> dar, Grafik B die prozentuale Transmigrationsrate der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>oral</sup> und K<sup>oral</sup>. Tabellarische Darstellung der statistischen Signifikanzen der Migrationsraten finden sich in Tab. C. Die großen Buchstaben stellen den Vergleich innerhalb einer einzelnen Gruppe zwischen den einzelnen Versuchstagen dar, die kleinen Buchstaben stellen die Vergleiche der einzelnen Gruppen untereinander an einem Versuchstag dar; n=20, 5 Gruppen á 4 Tiere.

#### 4.5 Einfluss von *Coffea praeparata* und Koffein auf die Proliferation von mononukleären Zellen im Tierversuch

Die im Tierversuch gewonnenen Blutproben wurden für 48 Stunden jeweils mit 2 in Vorversuchen evaluierten Mitogenen, ConA (3.2.3) und PHA (3.2.3), stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch auf Effekte bezüglich morphologischer Veränderung der Zellen untersucht (3.3.10). Als Indikator diente dafür die Veränderung der Zellen im FSC-H.

Mit Ausnahme der Kontrollgruppe  $K^{\text{ontr}}$  reagierten die MNC aller Gruppen auf die Stimulation mit ConA für 48 Stunden mit einer ggr. aber signifikanten Zunahme ihrer Größe im Laufe der Untersuchung.

Hierbei reagierten die Gruppen  $Cp^{\text{sc}}$ ,  $Cp^{\text{oral}}$  und  $K^{\text{oral}}$  vergleichbar mit einem ggr., jedoch signifikanten Anstieg der Größe (ermittelter FSC-H) im Verlauf des gesamten Tierversuches von Tag 0 über Tag 2 auf Tag 7, wobei die Zellen der Gruppe  $Cp^{\text{sc}}$  mit einer relative Größenzunahme von Tag 0 auf Tag 7 um den Faktor 1,2 ( $p \leq 0,001$ ) die deutlichste Zunahme zeigten (siehe Abb. 26 A,B,E). Die Gruppe  $K^{\text{sc}}$  wies ebenfalls einen geringgradigen Anstieg Ihrer Zellgröße auf, jedoch war dieser nur von Tag 2 auf 7 signifikant.

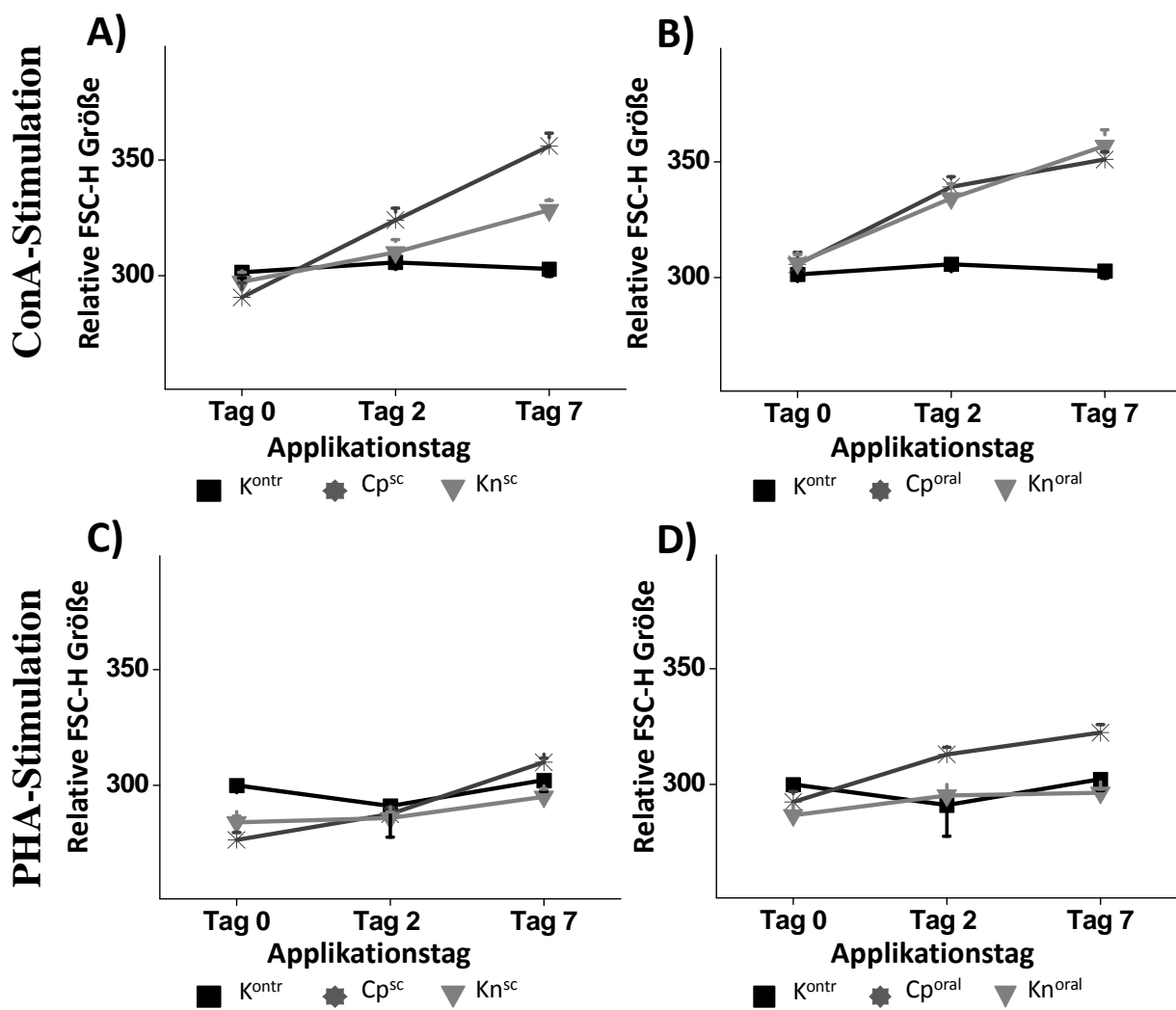
Im Vergleich der Gruppen untereinander an den einzelnen Tagen des Versuches sind neben den signifikanten Unterschieden aller Gruppen mit Ausnahme der Gruppe  $K^{\text{sc}}$  an Tag 2 zu der Gruppe  $K^{\text{ontr}}$  insbesondere die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen  $Cp^{\text{sc}}$  und  $Cp^{\text{oral}}$ , sowie den Gruppen  $K^{\text{sc}}$  und  $K^{\text{oral}}$  auffallend, der gleiche Wirkstoff unterscheidet sich hier an Tag 2 applikationsabhängig. Dieser Unterschied war an Tag 7 nur noch zwischen den Gruppen  $K^{\text{sc}}$  und  $K^{\text{oral}}$  darzustellen (siehe Abb. 26 E).

Nach Stimulation mit PHA für 48 Stunden zeigten sich für die Gruppen  $Cp^{\text{sc}}$  und  $Cp^{\text{oral}}$  die gleichen Tendenzen wie in den mit ConA stimulierten Proben, jedoch war hier der Anstieg der Zellgröße noch dezenter (siehe Abb. 26 C, D,F). Auffallend war der vergleichbare Verlauf der Gruppen  $Cp^{\text{sc}}$  und  $Cp^{\text{oral}}$ , welche mit einem ggr. moderaten aber signifikanten Anstieg der Zellgröße im Verlauf des Versuches reagierte ( $274 \pm 4$  bzw.  $292 \pm 4$  an Tag 0 auf  $310 \pm 2$  resp.  $322 \pm 3$  am Tag 7) und das Verhalten der Gruppen  $K^{\text{sc}}$  und  $K^{\text{oral}}$ , bei denen keine signifikanten Veränderungen zwischen den Untersuchungstagen vorlagen. Gruppe  $K^{\text{ontr}}$  reagierte wie



vorher mit keiner signifikanten Veränderung bei Betrachtung der Zellgröße im Verlauf des Tierversuches.

Bei den Vergleichen der einzelnen Gruppen am jeweiligen Tag des Versuches ergaben sich insbesondere zwischen den Gruppen  $Cp^{sc}$  und  $Cp^{oral}$  an allen Untersuchungstagen signifikante Unterschiede (siehe Abb. 26 F), währenddessen die Unterschiede zwischen den Gruppen  $K^{sc}$  und  $K^{oral}$  nur an Tag 2 signifikant waren (Abb. 26 F).



**E) ConA-Stimulation**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	bd,B	b,C
Cp <sup>oral</sup>	a,A	c,B	b,C
Kn <sup>sc</sup>	a,A	ad,A	c,B
Kn <sup>oral</sup>	a,A	bc,B	b,C
K <sup>ontr</sup>	a,A	a,A	a,A

**F) PHA-Stimulation**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	c,A	ac,B	a,C
Cp <sup>oral</sup>	b,A	b,B	c,C
Kn <sup>sc</sup>	abc,A	ab,A	b,A
Kn <sup>oral</sup>	b,A	c,A	b,A
K <sup>ontr</sup>	a,A	abc,A	ab,A

**Abb. 26** Proliferationsrate anhand der Größenzunahme von mononukleären Zellen unter Einfluss von *Coffea praeparata* und Koffein.

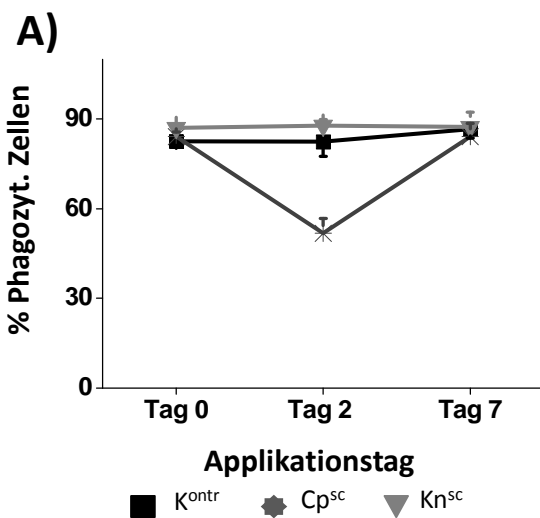
*Coffea praeparata* (Cp) und Koffein (Kn) wurden je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von jeweils 2 mg/ml auf zwei verschiedenen Wegen (subcutan, 1,5 ml (<sup>sc</sup>) oder per os, 4 ml (<sup>oral</sup>)) appliziert. Als Kontrolle diente physiologische Kochsalzlösung, die subcutan verabreicht wurde (K<sup>ontrolle</sup>, 1,5 ml). Die gewonnenen Proben wurden nach Blutentnahme an Tag 0, 2 und 7 mit ConA (10µg/ml) (Grafik A und B), respektive mit PHA (1µg/ml) (Grafik C und D) über 48 Stunden inkubiert. Grafik A stellt die Proliferation der Mononukleären Zellen im Tierversuch nach Stimulation mit ConA der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>sc</sup> und K<sup>sc</sup> dar, Grafik B die Proliferation der Mononukleären Zellen mit ConA der Gruppen K<sup>ontr</sup>, Cp<sup>oral</sup> und K<sup>oral</sup>. Grafik C und D dementsprechend die Proliferation der Mononukleären Zellen im Tierversuch nach Stimulation mit PHA. Tabelle E stellt die signifikanten Unterschiede der Stimulation mit ConA dar, Tabelle F die signifikanten Unterschiede der Stimulation mit PHA. Die großen Buchstaben stellen den Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen zwischen den einzelnen Versuchstagen dar, die kleinen Buchstaben stellen die Vergleiche der einzelnen Gruppen untereinander an einem Versuchstag dar; n=50, 5 Gruppen á 10.

#### 4.6 Modulatorische Wirkung von *Coffea praeparata* und Koffein auf die Phagozytoseleistung im Tierversuch

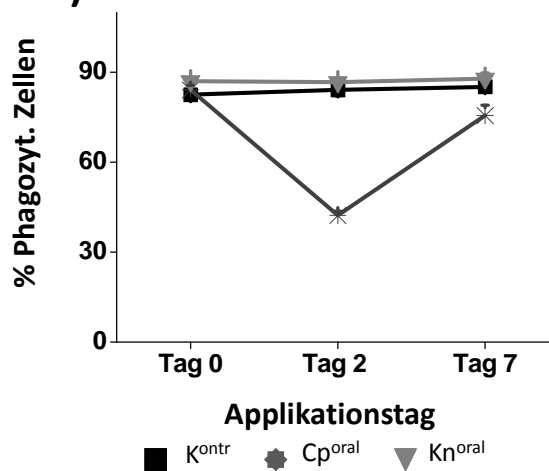
Die Fähigkeit des Koffeins, die Phagozytose quantitativ oder qualitativ zu beeinflussen sollte im Rahmen des Tierversuches, wie auch in *In-vitro*-Studien überprüft werden (3.3.11).

Dabei war von Interesse wie viele Zellen phagozytiert hatten (Anzahl) und welche Menge an Bakterienzellen aufgenommen worden war (Leistung). Die einzelnen Tiergruppen wurden sowohl mit der Negativkontrolle als auch untereinander verglichen. Mit Ausnahme der Gruppen Cp<sup>sc</sup> und Cp<sup>oral</sup> konnten weder für den Punkt Anzahl noch für den Punkt Leistung statistisch signifikante Änderungen der Phagozytose beobachtet werden. Die Gruppen Cp<sup>sc</sup> und Cp<sup>oral</sup> zeigten am Tag 2 im Vergleich zu den drei anderen Gruppen sowohl in Bezug auf die Menge an phagozytierenden Zellen als auch auf die Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle einen signifikanten Abfall (Abb. 27E). Hierbei zeigte sich zudem, dass die Gruppe Cp<sup>oral</sup> an Tag 2 eine statistisch signifikant niedrigere Menge an phagozytierenden Zellen als die Gruppe Cp<sup>sc</sup> aufwies.

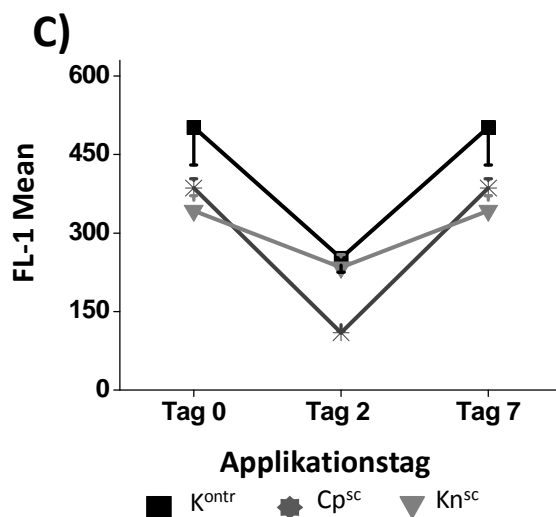
Anzahl phag. Zellen



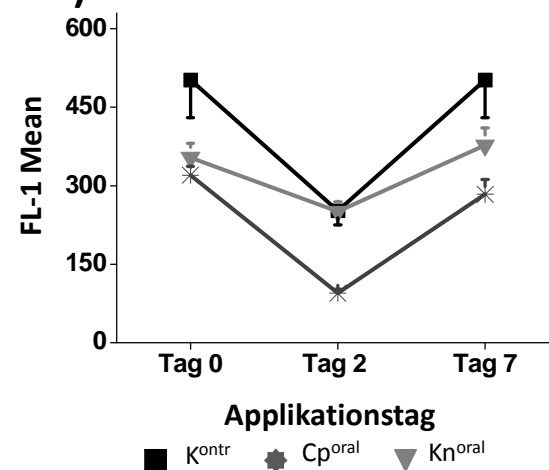
B)



Menge der aufg. Bakt.



D)



E) Anzahl phag. Zellen

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	b,B	a,C
Cp <sup>oral</sup>	a,A	b,B	c,C
Kn <sup>sc</sup>	a,AB	a,A	a,B
Kn <sup>oral</sup>	a,AB	a,A	a,AB
K <sup>ontr</sup>	a,A	a,A	a,A

F) Menge der aufg. Bakt.

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>sc</sup>	a,A	b,B	a,C
Cp <sup>oral</sup>	a,A	b,B	c,C
Kn <sup>sc</sup>	a,AB	a,A	a,B
Kn <sup>oral</sup>	a,AB	a,A	a,AB
K <sup>ontr</sup>	a,A	a,A	a,A

**Abb. 27** Phagozytoseleistung von porzinen Leukozyten unter *Coffea praeparata* und Koffein in Vollblut.

*Coffea praeparata* (Cp) und Koffein (Kn) wurden je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von jeweils 2 mg/ml auf zwei verschiedenen Wegen (subcutan, 1,5 ml (<sup>sc</sup>) oder per os, 4 ml (<sup>oral</sup>)) appliziert. Als Kontrolle diente physiologische Kochsalzlösung, die subcutan verabreicht wurde ( $K^{\text{kontrolle}}$ , 1,5 ml). Die gewonnenen Proben wurden nach Blutentnahme an Tag 0, 2 und 7 auf ihre Phagozytoseeigenschaften mittels eines Phagotests (Orpegen) untersucht. Grafik A stellt den Prozentsatz phagozytischer Zellen der Gruppen  $K^{\text{ontr}}$ ,  $Cp^{\text{sc}}$  und  $K^{\text{sc}}$  dar, Grafik B den Prozentsatz phagozytischer Zellen der Gruppen  $K^{\text{ontr}}$ ,  $Cp^{\text{oral}}$  und  $K^{\text{oral}}$ . Grafik C und D dementsprechend die Menge der aufgenommenen Bakterien indirekt über den FL-1 mean bestimmt. Tabelle E stellt die signifikanten Unterschiede der Menge an phagozytierenden Zellen dar, Tabelle F die signifikanten Unterschiede des FL1-Mean dieser Zellen. Die großen Buchstaben stellen den Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen zwischen den einzelnen Versuchstagen dar, die kleinen Buchstaben stellen die Vergleiche der einzelnen Gruppen untereinander an einem Versuchstag dar; n=50, 5 Gruppen á 10.

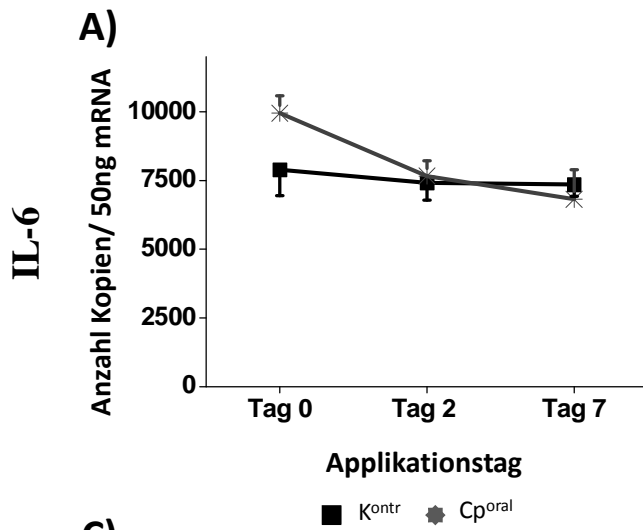
#### 4.7 Einfluss von *Coffea praeparata* auf die mRNA-Expression ausgewählter Gene in Gesamtleukozyten

*Coffea praeparata* wurde auf die Fähigkeit untersucht, einen Einfluss durch orale Applikation auf die Genexpression von IL-6, Prostaglandin-G/H-Synthase-2 und Arachidonat-5-Lipoxygenase in Gesamtleukozyten auszuüben (3.3.13; 3.3.13). Im Folgenden werden die Gesamtzahlen der Kopien angegeben, welche sich in 50 ng Gesamt-RNA befanden.

Nur die Tiere der Gruppe  $Cp^{\text{oral}}$  wiesen von Tag 0 zu Tag 2 eine geringgradige, aber signifikante Reduktion der Expression von IL-6 auf. An Tag 7 blieb das Niveau der Expression hingegen auch für diese Gruppe unverändert (siehe Abb. 28A). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung an allen Untersuchungstagen (Siehe Abb. 28 B)

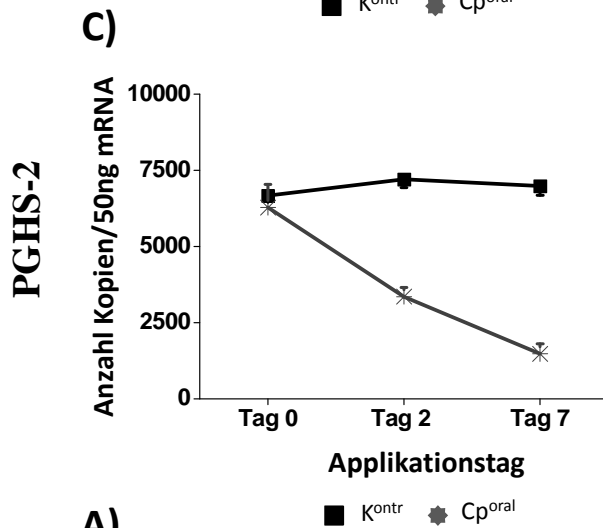
Die Prostaglandin-G/H-Synthase-2 Genexpression wurde nach Gabe von *Coffea praeparata* bei der Gruppe  $Cp^{\text{oral}}$  hochsignifikant reduziert. Diese Reduktion konnte über den Verlauf des Versuches, von Tag 0 zu Tag 2 und weiter zu Tag 7 dargestellt werden (Siehe Abb. 28C) Nach 7 Tagen und mehrmaliger Applikation des Wirkstoffes kam es zu einer Reduzierung der Genexpression um das Vierfache ( $p \leq 0,001$ ). Die Unterschiede zu der Gruppe  $K^{\text{ontr}}$  waren am Tag 2 und 7 erwartungsgemäß signifikant ( $p \leq 0,001$ ).

Die Genexpression der Arachidonat-5-Lipoxygenase wurde durch Gabe von *Coffea praeparata* sowohl nach einmaliger, wie auch nach mehrmaliger Applikation nicht beeinflusst. Insgesamt blieb die Genexpression auf einem sehr niedrigen Niveau (siehe Abb. 28E ). Statistisch gesehen ergaben sich keine Unterschiede innerhalb der Gruppen Cp<sup>oral</sup> und K<sup>ontr</sup> an den Untersuchungstagen. Beide untersuchte Gruppen unterschieden sich jedoch voneinander (siehe F). Die Gruppe K<sup>ontr</sup> zeigte bezüglich aller 3 gemessenen Genexpressionen im Verlauf der Untersuchungen an den drei Untersuchungszeiträumen keine statistisch signifikanten Veränderungen (siehe Abb. 28).



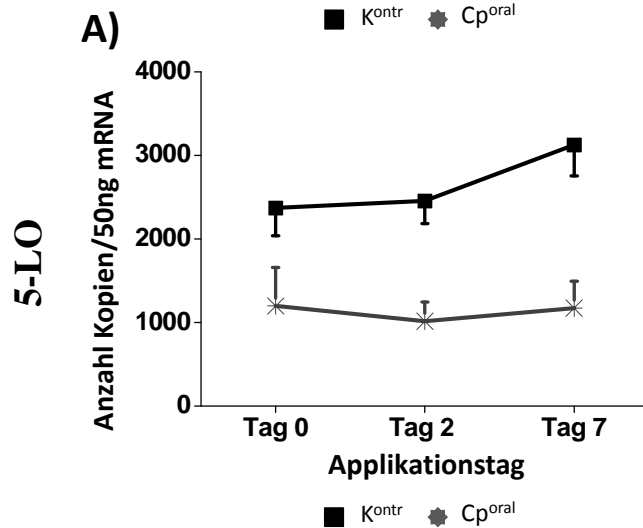
**B)**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>oral</sup>	bA	aA	aA
K <sup>ontr</sup>	aA	aA	aA



**D)**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>oral</sup>	aA	bB	cC
K <sup>ontr</sup>	dA	dA	dA



**B)**

Gruppen	Tag 0	Tag 2	Tag 7
Cp <sup>oral</sup>	aA	aA	aA
K <sup>ontr</sup>	bB	bB	bB

**Abb. 28** Genexpression von IL-6, Prostaglandin-synthase-2 und Arachidonat-5-Lipoxygenase in Gesamtleukozyten des Blutes unter dem Einfluss von *Coffea praeparata*.

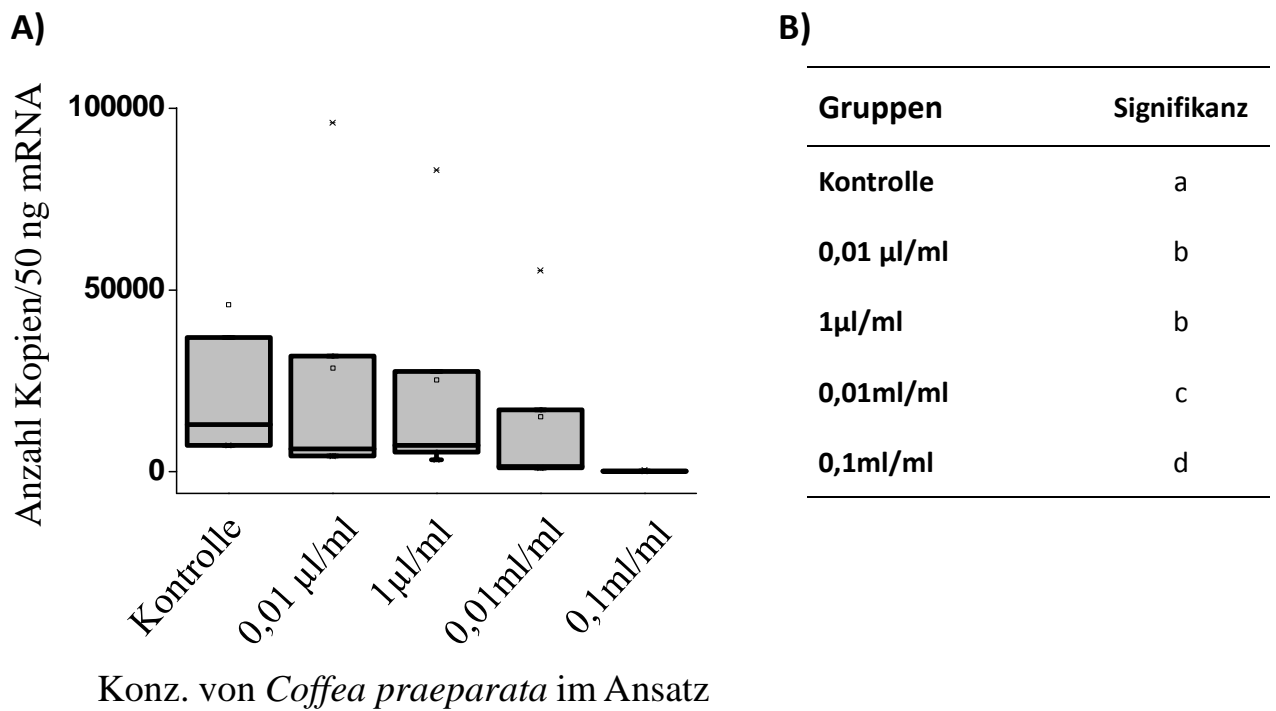
Tieren der Gruppe Cp<sup>oral</sup> (n=10) wurde *Coffea praeparata* per os (4 ml) je vier Mal in zweitägigen Abständen (Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6) in einer Konzentration von 2 mg/ml Koffein appliziert, während Kontrolltiere (K<sup>omir</sup>, n=10) physiologische NaCl-Lösung (per os 4 ml) erhielten. Die Blutproben wurden an Tag 0, 2 und 7 gewonnen, Gesamtleukozyten separiert und mittels PCR auf die Genexpression von IL-6 (A), Prostaglandin-synthase-2 (C) und Arachidonat-5-Lipoxygenase (E) untersucht. Die mRNA-Expression ist in Anzahl der Kopien bezogen auf 50g Total-RNA angegeben. Die Tabellen B, D und F geben die signifikanten Unterschiede zu den jeweils vorgestellten Grafiken wieder. Die großen Buchstaben stellen den Vergleich innerhalb einer einzelnen Gruppe zwischen den einzelnen Versuchstagen dar, die kleinen Buchstaben stellen die Vergleiche der einzelnen Gruppen untereinander an einem Versuchstag dar; n=12, 2 Gruppen á 6.

#### **4.8 Einfluss von *Coffea praeparata* auf die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ *in vitro***

Um zu überprüfen, ob *Coffea praeparata* in der Lage ist, die Expression von TNF- $\alpha$  zu beeinflussen, wurden Leukozyten für 16 Stunden mit den *Coffea praeparata*-Konzentrationen 0,1 ml/ml (1/10), 0,01 ml/ml (1/100), 1  $\mu$ l/ml (1/1000) und 0,01  $\mu$ l/ml (1/100000) inkubiert und anschließend mittels qPCR auf die Anzahl der Kopien je 50 ng RNA untersucht (3.3.13 3.3.13).

Bei zunehmender Konzentration des eingesetzten *Coffea praeparata* sank die Anzahl der Kopien je 50 ng mRNA. Bei der geringsten Verdünnung von 0,01  $\mu$ l/ml lag die Anzahl der Kopien bei  $28\ 585 \pm 17\ 669$  ( $p \leq 0,05$ ). Die Mittelwerte mit dieser Konzentration an *Coffea praeparata* inkubierten Zellen wiesen damit eine um 40 % geringere Genexpression von TNF- $\alpha$  im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Streuung ist der Grafik (Abb. 29A) zu entnehmen. Bei einer Konzentration von 1  $\mu$ l/ml lag die Genexpression auf vergleichbarem Niveau (Abb. 29A,B). Ab einer Konzentration von 0,01 ml/ml sank die Genexpression hochsignifikant ab (Abb. 29B) und lag um ca. 68% niedriger als die Kontrolle ( $p$  je  $\leq 0,05$ ). Zellen, welche mit einer Konzentration von 0,1 ml/ml inkubiert waren, wiesen kaum noch eine Genexpression auf. Es ergab sich eine Reduktion um 99% (siehe 29 A, B).





**Abb. 29** Darstellung des Einflusses von *Coffea praeparata* auf die Genexpression von TNF  $\alpha$ . Separierte Zellen wurden für 16 Stunden mit *Coffea praeparata*-Dosen unterschiedlicher Konzentration (0,01 µl/ml, 1µl/ml, 0,01ml/ml, 0,1 ml/ml) inkubiert. Anschließend wurde mithilfe der PCR die Anzahl der Kopien pro 50ng Gesamt-RNA untersucht (Grafik A). Tabelle B stellt signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen dar; n=5.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Expressionsverteilung des Adenosinrezeptors Typ A2a differiert auf porzinen Immunzellen**

Koffein vermittelt seine Wirkungen im Organismus zum Teil durch die Analogie zum körpereigenen Adenosin (HORRIGAN et al. 2006). Dabei wird als der wesentliche Schritt die Kopplung an den Adenosinrezeptor angesehen (FREDHOLM et al. 2001). Aus der Literatur geht hervor, dass der für die Rolle im Immunsystem bedeutendste Rezeptorsubtyp der am weitesten verbreitete Adenosinrezeptor A2a ist (LINDEN et al. 1999) und dieser in jedem Zelltyp des Organismus - wenn zum Teil auch auf niedrigem Expressionsniveau - vertreten zu sein scheint (PIERCE et al. 1992).

Ziel dieses Versuches war es, die Expression des A2a-Rezeptors auf porzinen Leukozyten nachzuweisen. Mithilfe der Membranimmunfluoreszenz konnte bei neutrophilen Granulozyten ein hoher Anteil A2aR-positiver Zellen dargestellt werden, was sich mit den Darstellungen Cronsteins deckt (CRONSTEIN et al. 1990).

In der Literatur wird in Bezug auf die eosinophilen Granulozyten das Augenmerk eher auf den Rezeptorsubtyp A3 gelegt (KOHNO et al. 1996; KNIGHT et al. 1997; WALKER et al. 1997); über den Subtyp A2a fehlen ausreichende Referenzen. An dieser Stelle kann darüber spekuliert werden, ob das Fehlen in der Literatur ein Hinweis darauf sein könnte, dass Eosinophile generell eher den Subtyp A3 als A2aR exprimieren. Dies würde erklären, warum der Subtyp A2aR in der vorliegenden Arbeit nicht auf Eosinophilen nachgewiesen werden konnte. Da der eingesetzte Antikörper bei Neutrophilen allerdings schlüssige Ergebnisse lieferte, kann eine schlechte Bindung des Antikörpers als Ursache für niedrige Fluoreszenz ausgeschlossen werden. Koshiba et al. haben für verschiedene Leukozyten (Neutrophile und T-Zellen) dargestellt, dass sie erst nach Aktivierung vermehrt Rezeptoren auf der Oberfläche ausprägen (KOSHIBA et al. 1997). Es könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch Eosinophile den Rezeptorsubtyp nicht konstitutiv exprimieren, sondern nach Bedarf und Stimulus ausbilden.

Dass Monozyten Adenosinrezeptoren insbesondere den A2aR exprimieren, stimmt mit den in der Literatur gemachten Angaben überein (FREDHOLM et al. ; J. E. SALMON u. CRONSTEIN 1990; FREDHOLM 1995; FREDHOLM et al. 2001; HASKO et al. 2008). Auch die A2aR-Verteilung auf porzinen Lymphozytensubsets ist in der Literatur beschrieben und konnte in dieser Arbeit dementsprechend gezeigt werden (ONDRACKOVA et al. 2012; ONDRACKOVA et al. 2013).

## **5.2 *Coffea praeparata* und Koffein beeinflussen insbesondere die Monozytenzellzahl des peripheren Blutes bei mehrmaliger oraler Applikation beim Schwein**

Ziel dieses Versuches war es, zu untersuchen, ob eine ein- oder mehrmalige Gabe von Coffea oder Koffein die Anzahl der Leukozyten im Blut und damit Teile des Blutbilds statistisch beeinflusst. Dass sämtliche Leukozytenwerte aller des am Tierversuch teilnehmender Probanden im Referenzbereich (Referenz: Labor der Klinik für kleine Klautiere, Tierärztliche Hochschule Hannover) der Tierart lagen, soll vorab nicht unerwähnt bleiben. Insgesamt ergab sich ein homogenes Bild mit vergleichbaren Leukozytenwerten, lediglich zwei Gruppen fielen durch einen geringgradigen, jedoch signifikanten Anstieg der Leukozyten innerhalb des Referenzbereiches auf. In den Gruppen Cp<sup>oral</sup> und Kn<sup>sc</sup> erfolgte am Tag 7, nach mehrmaliger Applikation, ein geringgradiger jedoch signifikanter Anstieg.

Der Anstieg der Leukozyten kann in normalen, physiologischen tierartlichen Schwankungen begründet sein. Anzumerken ist, dass sich gegenüber der Kontrollgruppe keine Veränderungen in Bezug auf die Leukozytenzahl einstellten. In der Literatur gibt es keine Hinweise auf eine Veränderung der absoluten Leukozytenzahlen durch Koffein.

Da es sich um eine geringe Schwankung handelt, die im physiologischen Bereich liegt, könnten auch Messungenauigkeiten eine Rolle gespielt haben, wobei auf eine Standardisierung in allen Probenentnahmen und Aufarbeitungen geachtet wurde.

Bei Betrachtung der absoluten Lymphozytenzahlen ließen sich insgesamt keine substantziellen Unterschiede bei den verschiedenen applizierten Substanzen feststellen. Weder *Coffea* noch Koffein waren in der Lage, die Lymphozytenzahl zu beeinflussen.

Die relativen Werte wiesen im Verlauf der Untersuchung einige geringgradige aber signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen auf. Die Absenkung der Lymphozyten der Gruppe Kn<sup>oral</sup> von 65 % auf 56% gefolgt von einem Anstieg am Tag 7 auf 65% ist hier besonders hervorzuheben (Abb. 19 D). Ursache für die Veränderungen der relativen Werte ist, dass sich die Werte anderer Blutzellen, wie etwa der Monozyten ändern und so indirekt die relativen Prozentzahlen der anderen Blutwerte mit beeinflussen. Relevanter ist demnach eine Veränderung der absoluten Zahlen.

Bei einer Studie von Bishop et al. wurde festgestellt, dass eine Stunde nach Gabe von Koffein die Lymphozytenzellzahl vor allem des Subsets CD8+ signifikant höher waren als in der Kontrollgruppe. Nach dieser Stunde erfolgte eine 90-minütige sportliche Betätigung (Laufen) als Stimulus. Die Erhöhung der Lymphozytenzahl und des Subsets CD8+ war nach der sportlichen Betätigung und einige Stunden später statistisch nicht mehr darzustellen (BISHOP et al. 2005). Interessanterweise zeigten die Ergebnisse von Bishop, dass die CD4+CD69+ und die CD8+CD69+ Zellen eine Stunde nach Koffeingabe sowie nach 90-minütiger Betätigung anstiegen. Auch wenn dieser Effekt nach einigen Stunden nicht mehr darstellbar ist, gilt CD69+ jedoch als ein *early-activation marker*, der mit einer gesteigerten T-Zell Proliferation und zytotoxischen Aktivität assoziiert wird (MUELLER et al. 2002). Im vorliegenden Tierversuch wurde das Blut ca. 24 Stunden nach Gabe auf etwaige Effekte untersucht. Die hier gewonnenen Ergebnisse decken sich auch mit den Ergebnissen von Bishop. Um den beschriebenen *early-activation-Effekt* nachweisen zu können, wäre eine Messung ca. 2 Stunden nach Applikation zielführend gewesen. Desweiteren ist eine weitere Untersuchung über das Verhalten der einzelnen Subsets (CD4+, CD8+) für die genauere Charakterisierung hilfreich. Eine Differenzierung beider Subsets fand aus Praktikabilitätsgründen nicht statt.

Bei 3 der 4 Wirkstoffgruppen stiegen die Zahl und der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den Leukozyten im Verlauf der Applikation signifikant an. Gruppe Cp<sup>oral</sup> bildete hier eine Ausnahme. Der moderate Anstieg bewegte sich im Rahmen der Referenzwerte und war bei 3 Gruppen gut darzustellen. Da die Tiere des Versuches einem vergleichbaren Stress ausgesetzt waren, kann auch hier der Grund in den veränderten, gestiegenen Leukozytenzahlen in den

physiologischen Schwankungen der Granulozytenzahlen zu finden sein. Auch die Kontrollgruppe reagierte mit einem geringgradigen, jedoch nicht signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten. Da jedoch 3 der 4 Gruppen ähnliche Verläufe aufwiesen, kann auch eine mögliche vermehrte Rekrutierung der segmentkernigen Granulozyten auf physiologischem Niveau nicht ausgeschlossen werden. Eine Steigerung der neutrophilen Granulozytenzahlen im Blut konnte bei der Maus erst bei hohen Dosen Koffein festgestellt werden. Versuche mit verschiedenen Konzentrationen an Koffein zeigten, dass es erst ab einer 10-fach höheren Dosierung, als in diesem Versuch verwendet wurde, zu signifikanten Effekten in Bezug auf die Granulozytenzahlen kommt (RAMANAVICIENE et al. 2004). Diese hohen Dosierungen spiegeln jedoch nicht die pharmakologisch eingesetzten Mengen wieder und sind deswegen für die hier vorliegende Fragestellung irrelevant.

Beim Betrachten der Ergebnisse im Hinblick auf die Monozyten fällt insbesondere der hochsignifikante Anstieg der Monozytenzahlen der Gruppe Cp<sup>oral</sup> im Verlauf des Versuches auf, der an Tag 7 sogar über dem physiologischen Referenzbereich liegt. Diese Monozytose trat nur bei der Gruppe Cp<sup>oral</sup> auf. Zwei weitere Gruppen reagierten ebenfalls mit einer signifikanten Steigerung der Monozytenzahlen (Cp<sup>sc</sup> und Kn<sup>oral</sup>), jedoch nur nach einmaliger Applikation. Der Grund für die geringeren Anstiege in den übrigen Gruppen mag der Tatsache geschuldet sein, dass im Vergleich zur subkutanen Applikationsform die Menge des eingesetzten Wirkstoffes 2,6-mal höher war. Betrachtet man die sehr gute orale Bioverfügbarkeit von Koffein (MARKS u. KELLY 1973; BONATI et al. 1982; BLANCHARD u. SAWERS 1983), erklären sich viele der deutlicheren Befunde in dieser Gruppe, da mit einem vergleichbaren Wirkstoffspiegel bei oraler, wie bei subkutaner Applikation gerechnet werden kann (BONATI et al. 1982). Derselbe Grund dürfte wohl auch erklären, warum signifikante Effekte in der Gruppe Kn<sup>oral</sup> darstellbar waren, nicht jedoch in der Gruppe Kn<sup>sc</sup>. Auch hier liegt die Menge des eingesetzten Wirkstoffes 2,6-mal höher.

Hervorzuheben ist insbesondere der Anstieg der prozentualen Monozyten in Gruppe Cp<sup>oral</sup> um das Dreifache von 0 auf Tag 7 ( $p \leq 0,005$ ). (Abb. 21 B,D). Bei einer Studie mit Mäusen, in der die Monozytenzahl im Blut nach Administration von Koffein untersucht wurde, stellten sich vergleichbare Ergebnisse dar. Die eingesetzten Mengen von Koffein in der Studie waren allerdings höher, als die hier verwendeten, jedoch sind die sichtbaren Effekte tendenziell die

gleichen. In der Studie stieg die Anzahl der Monozyten im Blut um den Faktor 2.5 ( $p \leq 0,05$ ) (RAMANAVICIENE et al. 2004).

Da Monozyten sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunantwort eine wichtige Rolle spielen, scheint *Coffea praeparata* und auch Koffein durch die Rekrutierung vermehrter Monozyten eine Beeinflussung des Immunsystems zu bedingen. Eine weitere Untersuchung auf die Expression von Monozyten-stimulierenden Faktoren (IL-12, IFN- $\gamma$  etc.) kann hier weiterführende Erkenntnisse bringen.

Die absolute Zahl der eosinophilen Granulozyten im Blut zeigte keine signifikanten Veränderungen im Verlauf des Versuches. So scheinen *Coffea praeparata* und Koffein bei den eingesetzten Konzentrationen nicht in der Lage zu sein, einen Einfluss auf die Menge der zirkulierenden Eosinophilen zu haben. Signifikante Unterschiede in den prozentualen Zahlen zwischen den Gruppen lassen sich eher mit einer Verschiebung in Bereichen anderer Leukozyten erklären.

Eine Studie von Ramanaviciene an Mäusen ergab einen Anstieg der Eosinophilen Granulozyten erst bei deutlich höheren Koffeindosierungen. Bei Verabreichung vergleichbarer Mengen von Koffein ergaben sich auch bei der Studie keine signifikanten Effekte (RAMANAVICIENE et al. 2004).

*Coffea praeparata* und Koffein scheinen keinen Einfluss auf die Zahl der basophilen Granulozyten im Blut zu haben. Nach eingehender Literaturrecherche fanden sich keine Quellen zu diesem Thema.

In Bezug auf die Auswertung des Zellbildes lässt sich festhalten, dass *Coffea praeparata* und Koffein nur auf Monozyten- und Granulozytenzahlen einen Effekt haben. Hierbei liegen deutliche Unterschiede in der Applikationsart und der eingesetzten Substanz. Eine orale Applikation mit höheren Dosen führt insbesondere bei den Monozyten aber auch bei den Granulozyten zu signifikanteren Anstiegen. Desweiteren wirkt *Coffea praeparata* potenter als Koffein im Hinblick auf Zellbildveränderungen. Die Annahme, dass *Coffea praeparata* und Koffein immunmodulierende Wirkungen haben, bestätigt sich und deckt sich sehr gut mit den in der Literatur bereits erwähnten Studien. Der Adenosinrezeptor als ein Wirkungsmechanismus der eingesetzten Substanzen konnte auf beiden Zelltypen in dieser Studie dargestellt werden.

### **5.3 *Coffea praeparata* steigert die Expression von L-Selektinen auf MNC *ex vivo* nach einmaliger Gabe**

Bei L-Selektin (CD62L) handelt es sich um ein auf Leukozyten exprimiertes Oberflächenmolekül, das die „Rollen“ und die „Anheftung“ der Leukozyten entlang und an die Gefäßwand unterstützt. Die Wechselwirkungen mit den gefäßwandständigen Oberflächenmolekülen führen zu einer reversiblen Anheftung. Dies führt letztlich zur Diapedese der Leukozyten (ROBBINS 1998).

Im Falle einer erhöhten L-Selektin-Expression käme es zu einer vermehrten Abwanderung von MNC's aus dem Lumen des Blutgefäßes. Da ein erkennbarer Effekt von *Coffea praeparata* und Koffein auf die Monozyten und einige Effekte auf andere Leukozyten eingetreten ist, sollte überprüft werden, ob dieser Mechanismus hier zum Tragen kam.

Der Test wurde an der Tiergruppe mit den stärksten Effekten und der Kontrollgruppe durchgeführt, die wie zu erwarten keine Veränderungen zeigte. Sowohl der Prozentsatz L-Selektin-positiver MNC wie auch die mittlere Fluoreszenzintensität positiver Zellen der Gruppe Cp<sup>oral</sup> stiegen nach einmaliger Gabe von *Coffea praeparata* signifikant an. Der Abfall nach mehrmaliger Administration kann auf einen Gewöhnungseffekt des Koffeins zurückzuführen sein, wie schon durch Horrigan und andere beschrieben (HORRIGAN et al. 2006). Eine hohe Expression von L-Selektinen auf Immunzellen ist ein frühes Signal für die Aktivierung und Ausdifferenzierung (KOHN et al.). Da *Coffea praeparata* in der eingesetzten Konzentration zu einer Erhöhung von L-Selektin-positiven Zellen geführt hat, kann eine immunmodulierende Wirkung zumindest nach einmaliger Administration vermutet werden. Ein Langzeiteffekt stellt sich, das L-Selektin betreffend, nicht ein. In der Literatur finden sich lediglich Studien über die Wirkung von Adenosin auf die L-Selektin-Produktion, nicht von Koffein. In einer Studie wurde dargestellt, dass Adenosinagonisten zu einem signifikanten Verlust von L-Selektin positiven Zellen führt (TAJIMA et al. 2001). Koffein (und damit auch *Coffea praeparata*) als Antagonist des Adenosins müsste diese Wirkung verhindern, oder ihr entgegenwirken. Die hier dargestellten Ergebnisse stützen diese Theorie. Eine weitere Studie

hat die Rolle des A3-Rezeptors bei Entzündungen untersucht. Hier erfolgte zwar eine verringerte Ausbildung des Leukotriens B4 (LTB<sub>4</sub>), jedoch wurde die L-Selektin-Ausbildung nicht beeinflusst (KNIGHT et al. 1997). Die PMN wiesen keine signifikanten Veränderungen in Ihren L-Selektin-Expressionsmustern auf. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Knight et al. (KNIGHT et al. 1997). Nicht abschließend geklärt ist der geringgradige, jedoch signifikante Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe Cp<sup>oral</sup> in Bezug auf den Anteil positiver Zellen. Die Niveaus beider Gruppen verändern sich im Laufe der Untersuchung nicht, sind jedoch unterschiedlich.

#### **5.4 *Coffea praeparata* und Koffein haben keinen nachweisbaren Effekt auf die Migrationsfähigkeit von Leukozyten**

Eine wichtige funktionelle Eigenschaft von Leukozyten ist deren Fähigkeit, auf einen chemotaktischen Reiz hin zu wandern. Extravasation und Migration zu einem Infektionsherd und von einem lymphatischen Gewebe zum anderen sind wichtige Funktionen von Leukozyten. Unter Chemotaxis versteht man die gerichtete Bewegung von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten bestimmter chemotaktischer Faktoren (JANEWAY 2002). Mithilfe der Transmigrationskammer sollte überprüft werden, ob dies den Zellen behandelte Tiere schwerer oder leichter fällt.

Sowohl *Coffea praeparata* als auch Koffein haben in keiner der beiden Applikationsformen positiven oder negativen Einfluss auf die Transmigrationsfähigkeit der Immunzellen. Obwohl aus den Literaturquellen vereinzelt eine solche Modulation zu erwarten gewesen wäre, konnte sie in der vorliegenden Arbeit mit diesem Versuchsaufbau und den gewählten Intervallen nicht belegt werden. Die bisher erfolgten Studien konzentrierten sich auf das Adenosin und dessen Fähigkeit, die Transmigration von Zellen in das Entzündungsgeschehen zu beeinflussen. Ergebnis dieser Studien war eine deutliche Steigerung der Migrationsrate nach Stimulation mit Adenosin oder entsprechenden Agonisten (IUR'EVA et al. 2014; RING et al. 2015). Die Untersuchungen wurden einige Stunden nach Inkubation durchgeführt. Da Koffein ein Antagonist des Adenosins ist, wurde eine Reduzierung der Migrationsfähigkeit oder eine fehlende Beeinflussung erwartet. Sullivan et al. haben in ihren Versuchen Koffein



benutzt und keine Beeinflussung der Migrationsfähigkeit feststellen können (SULLIVAN et al. 1992).

*Coffea praeparata* respektive Koffein hemmen 24 Stunden nach einmaliger Gabe und auch nach Langzeitadministration die Transmigrationsfähigkeit der Zellen nicht. Die hier erhobenen Ergebnisse decken sich mit einigen der bereits durchgeführten Studien. Dass Koffein und damit auch *Coffea praeparata* keine antagonisierenden Wirkung auf die Adenosinfunktion ausübt, kann an den Messintervallen oder der zu geringen Konzentration liegen. *In-vitro*-Studien mit Adenosinantagonisten liegen derzeit nicht vor.

### **5.5 *Coffea praeparata* und Koffein führen zu einer verstärkten Proliferation von mononukleären Zellen**

Es sollte überprüft werden, ob *Coffea praeparata* und Koffein in der Lage sind, die Proliferation der mononukleären Zellen, insbesondere das Zellwachstum zu beeinflussen. Der Indikator für die Proliferation war die morphologische Veränderung, die mittels FACS im FSH-H dargestellt werden kann. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Mitogene, da in der Literatur in den *in-vitro*-Versuchen verschiedene Mitogene mit unterschiedlichen Ergebnissen eingesetzt wurden. Die Mitogene wurden in Vorversuchen auf Ihre Fähigkeit der Proliferation getestet.

Bei den mit ConA stimulierten Zellen erfolgte eine ggr. Größenzunahme, die mit zunehmender Applikationsdauer auf niedrigem Niveau zunahm. Dies betraf alle 4 Wirkstoffgruppen. Die Kontrollgruppe veränderte sich bei Stimulation nicht signifikant. Die Gruppe K<sup>sc</sup> reagierte im Laufe des Versuches mit den geringsten Veränderungen. *Coffea praeparata* war in beiden Applikationsformen fähig, die Immunzellen zu stimulieren; Koffein demgegenüber war in der oralen Applikationsart besser dazu in der Lage, als in der injizierten. Dieser Effekt wurde in unterschiedlichen Versuchsreihen dieser Arbeit festgestellt. Wie bereits erwähnt, wird der wahrscheinlichste Grund daran liegen, dass im Vergleich zur subkutanen Applikationsform die Menge des eingesetzten Wirkstoffes bei oraler Gabe 2,6-mal höher war. Die sehr gute orale Bioverfügbarkeit von Koffein (MARKS u. KELLY 1973; BONATI et al. 1982; BLANCHARD u. SAWERS 1983) wurde bereits erwähnt.

Betrachtet man die Ergebnisse für die Stimulation mit PHA, fällt auf, dass nur die mit *Coffea praeparata* applizierten Tiere eine Reaktion zeigen. Koffein allein hat keine Auswirkungen auf die Proliferation nach Stimulation mit PHA. Dies weist darauf hin, dass die übrigen Substanzen, welche im *Coffea praeparata* enthalten sind, einen nicht unerheblichen Teil ihres pharmakologischen Wirkungsprofils ausmachen und dass damit eine Reduzierung von *Coffea praeparata* rein auf den Gehalt an Koffein für bestimmte Fragestellungen nicht belegt werden konnte.

Huang et al. zeigten auf, dass das Adenosin einen stark hemmenden Einfluss auf die T-Lymphozytenfunktion hat (HUANG et al. 1997), Blackburn et al. wiesen diesen hemmenden Effekt auch für die B-Zellen nach (BLACKBURN et al. 1996; ALDRICH et al. 2003). Es ist davon auszugehen, dass Koffein als Adenosinantagonist zu einer Steigerung der Proliferation oder zumindest zu einer Aufhebung der Hemmung führt. Es liegen bislang nur Ergebnisse von *in-vitro*-Versuchen über die Rolle des Koffeins hinsichtlich der Proliferation vor. Diese Ergebnisse zeigen eine Dosis-abhängige Wirkung des Koffeins auf die Proliferation. Bei hohen Dosierungen von Koffein wurde eine geringgradige Unterdrückung der Proliferation von T- und B-Zellen (KANTAMALA et al. 1990; ROSENTHAL et al. 1992; HERRIGAN et al. 2006) erreicht. Bei den hier vergleichbar eingesetzten Dosen trat kein Effekt auf (KANTAMALA et al. 1990; ROSENTHAL et al. 1992; HERRIGAN et al. 2006).

In den *in-vitro*-Studien, die eine geringgradige Unterdrückung aufwiesen, wurden die Zellen länger inkubiert, zwischen 72 Stunden und 120 Tagen. Aufgrund des unterschiedlichen Studiendesigns können unterschiedliche Ergebnisse entstehen. Die in diesem Versuch aufgezeigte Größenzunahme der MNC, insbesondere nach Gabe von *Coffea praeparata*, spricht für immunmodulatorische Fähigkeiten der Substanz, die nicht nur auf dessen pharmakologisch wirksamen Bestandteil Koffein zurückzuführen ist. Im direkten Vergleich beider Substanzen stellte sich Koffein als weniger potent dar.

## **5.6 *Coffea praeparata* und Koffein haben nach einmaliger Gabe einen hemmenden Einfluss auf die Phagozytoseleistung im Tierversuch**

Die Phagozytose ist ein essentieller Mechanismus seitens der neutrophilen Granulozyten und der Makrophagen, um Antigene zu bekämpfen. Während dieses Prozesses werden Antigene mittels Invagination in sogenannte Phagosomen eingeschlossen, die dann in der Zelle mit Lysosomen zu Phagolysosomen verschmelzen (JANEWAY 2002).

Die erhobenen Daten ergeben eine Reduktion phagozytischer Zellen nach einmaliger Applikation von *Coffea praeparata* in beiden Darreichungsformen. Dieser Effekt ist auch für die mit Koffein behandelten Gruppen nachweisbar. Jedoch in Bezug auf ihre FL-1-Mittelwert, also der Menge der aufgenommenen Bakterien. Koffein als alleiniger Wirkungsträger im *Coffea praeparata* erscheint unwahrscheinlich, da die korrespondierende Dosis an Koffein allein einen deutlich geringeren Effekt auf die Reduzierung der Phagozytose hatte.

Beachtenswert ist die Tatsache, dass die Reduzierung der Phagozytosefähigkeit nur nach einmaliger Administration auftrat. Bei mehrmaliger Gabe erfolgte keine Verringerung der Phagozytoseleistung mehr, einige Gruppen reagierten sogar mit einer ggr. gesteigerten Phagozytoseleistung. Ein Gewöhnungseffekt durch eine Hochregulation der Rezeptoren erscheint hier wahrscheinlich (HORRIGAN et al. 2006). In der Literatur finden sich einige Studien, die die Rolle des Adenosins in Bezug auf die Phagozytose beschreiben. Generell galt lange, dass die Phagozytoseleistung von Makrophagen durch Adenosin reduziert wird (PIKE et al. 1978). Vor einiger Zeit fanden einige Forschergruppen jedoch heraus, dass bei Stimulation mit einem A1 Rezeptor-Agonisten undifferenzierte Monozyten eine vermehrte Phagozytose zeigen (J. E. SALMON et al. 1993). Undifferenzierte und juvenile Monozyten exprimieren vermehrt den A1-Rezeptor (EPPELL et al. 1989). Der A1-Rezeptorweg wurde auch für die Anregung der Neutrophilenfunktionen dargestellt; auch hier nahm nach Stimulation des A1R die Phagozytoseleistung zu (J. E. SALMON u. CRONSTEIN 1990; CRONSTEIN et al. 1992).

Der A1-Rezeptor wird bereits durch minimale Adenosinkonzentrationen aktiviert, bei höheren Konzentrationen von Adenosin (durch Entzündungen, Substitution, etc.) wird der A2a – Rezeptor aktiviert, was einen inhibitorischen Effekt auf die Funktion der Neutrophilen (CRONSTEIN et al. 1992) hat.

Möglicherweise reichen die einmalig gegebenen Dosen an *Coffea praeparata* und Koffein aus, um den A1-Rezeptor, nicht jedoch den A2aR zu antagonisieren. Nach Gewöhnung der Zellen an die Wirkstoffe kommt es zu einer Hochregulation insbesondere des A2aR (SVENNINGSSON et al. 1997). Um die Unterschiede im Verhalten der eingesetzten Präparate zu erklären, spielen möglicherweise weitere Inhaltsstoffe des *Coffea praeparata* eine wichtige Rolle. Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, reagierten alle Gruppen inklusive der Kontrollgruppe mit einer Erniedrigung an der Menge der aufgenommenen Bakterien nach einmaliger Applikation. Für die Kontrollgruppe und die Gruppen, die Koffein erhalten hatten, war diese Erniedrigung jedoch nicht signifikant. Diese Erniedrigung in Bezug auf die Menge der aufgenommenen Bakterien kann an einer stressinduzierten Immunsuppression durch die Manipulationen an Tag 0 und 1 zu erklären sein.

### **5.7 *Coffea praeparata* reduziert die Genexpression von Prostaglandin-G/H-Synthase- 2, hat jedoch keinen Einfluss auf die Genexpression von IL-6 und Arachidonat-5-Lipoxygenase im Tierversuch**

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2 oder PGHS-2), ist ein Enzym, das, Arachidonsäure zu Prostaglandin-H<sub>2</sub> oxidiert und bei Läsionen synthetisiert wird (O'BANION 1999).

*Coffea praeparata* hat einen messbaren Einfluss auf die m-RNA-Expression von (PGHS-2). Es war in der Lage, seine Expression bei Langzeitadministration um den Faktor 4 zu senken. Bereits einmalige Gaben von *Coffea praeparata* hatten einen statistisch nachweisbaren Effekt. Eine mögliche antiinflammatorische Funktion des *Coffea praeparata* mit protektiven Effekten für den Organismus könnte in dieser Erniedrigung der COX-2 liegen.

Cadieux et al. wiesen nach, dass Adenosin zu einer A1- und A2a-Rezeptor-vermittelten Stimulation der COX-2 auf mRNA Ebene führt. Dieses wurde auch für das exprimierte Protein COX-2 selbst bestätigt (CADIEUX et al. 2005). Pouliot et al. postulierten durch die Beschreitung des COX-2 Pfades die wichtige Rolle des Adenosins bei der Entzündung (POULIOT et al. 2002). Koffein als einer der Inhaltsstoffe des *Coffea praeparata* wirkt als Antagonist des Adenosins. Im beschriebenen Versuch zeigte sich dieser Antagonismus und lag somit im Einklang zu den bisher erhobenen Studien.

IL-6 gehört zu den Zytokinen, welche die Entzündungsreaktion des Organismus regulieren. Interleukin-6 ist ein Aktivator der Akute-Phase-Proteine und ist ein Lymphozyten-stimulierender-Faktor (TAGA u. KISHIMOTO 1992; GRAEVE et al. 1993). Im Falle einer Entzündung gehören neutrophile Granulozyten zu den ersten Immunzellen vor Ort. Il-6 führt zu einer verringerten Einwanderung von Granulozyten und im Gegenzug zu einer vermehrten Rekrutierung von Lymphozyten (GRAEVE et al. 1993).

Es stellten sich im Tierversuch keine Veränderungen hinsichtlich der Expression von IL-6 dar. Es erfolgte zwar nach einmaliger Gabe von *Coffea praeparata* eine Reduzierung. Diese war im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch statistisch nicht signifikant.

Über die Wirkungen von Koffein oder *Coffea praeparata* auf IL-6 liegen derzeit keine Studien vor, jedoch zeigen einige Studien eine Herabregulation diverser Zytokine nach Koffeinadministration auf. So wurden in *in-vitro*-Versuchen die Expression von IL 2, IL 4 (ROSENTHAL et al. 1992), IL 5 (HORRIGAN et al. 2006), IL 10 (VAN FURTH et al. 1995) und IFN- $\gamma$  gehemmt (RITTER et al. 2005).

Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO) oxidiert Arachidonsäure zu Leukotrien A<sub>4</sub>. Verschiedene Tumorgewebe zeigen eine erhöhte Ausschüttung von 5-LO. Es steht im Verdacht, an der Angiogenese beteiligt zu sein (J. A. SALMON u. HIGGS 1987). Je nach Anwesenheit von Cox 2 respektive Alox 5 wird die Arachidonsäure zu Prostaglandinen oder zu Leukotrienen synthetisiert. Dies ist von einiger Bedeutung für den weiteren Verlauf einer Entzündung (J. A. SALMON u. HIGGS 1987; JANEWAY 2002; CADIEUX et al. 2005).

*Coffea praeparata* war in den hier eingesetzten Konzentrationen und beim vorgegebenen Versuchsaufbau nicht in der Lage, die Genexpression von Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO) zu beeinflussen. Es wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt, so dass eine mögliche Immunmodulation mit Richtungsweisung auf den Cox-2-Pfad nicht nachzuweisen war. In der Literatur finden sich einige Quellen, welche sich mit der Rolle des Adenosins bei der Expression von 5-LO beschäftigen. Es konnte eine Hemmung der Biosynthese (FLAMAND et al. 2000) und damit die Lenkung der Entzündung über den COX-2 Pfad dargestellt werden (POULIOT et al. 2002). Die unterschiedlichen Expressionsniveaus zwischen beiden Gruppen sind beachtenswert. Jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden,

dass bei beiden Gruppen die Anzahl der Kopien/50ng mRNA zwischen 1000 und 3000 Kopien lagen, also auf einem sehr niedrigen Niveau.

Durch seine Rolle als Antagonist des Adenosins wurde für das in *Coffea praeparata* enthaltene Koffein eine Steigerung der 5-LO Expression erwartet. Diese trat jedoch nicht ein. Grund hierfür könnte eine zu geringe Dosis von Koffein sein. Weiterhin muss auch bedacht werden, dass weitere, im *Coffea praeparata* enthaltene Substanzen, den antagonisierenden Effekt des Koffeins wieder aufheben könnten.

Insgesamt decken sich die erhobenen Ergebnisse in Bezug auf die Genexpression sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen Effekten. Koffein als Antagonist führt zu einer Hemmung der COX-2 und darin könnte eine anti-inflammatorische Eigenschaft begründet sein. Diese Ergebnisse wurden sowohl auf Genexpressionsebene als auch auf der Ebene der Enzyme und Zytokine bereits für den Menschen und die Maus bestätigt (HORRIGAN et al. 2006). Eine immunmodulatorische Wirkung des Koffein und damit des *Coffea praeparata* über die Hemmung der Prostaglandin-G/H-Synthase- 2 konnte in dieser Arbeit bestätigt werden.

### **5.8 *Coffea praeparata* hat einen hemmenden Effekt auf die Genexpression von TNF- $\alpha$ in vitro**

TNF- $\alpha$  wird bei lokalen und systemischen Entzündungen vorwiegend von Makrophagen gebildet. Es ist in der Lage auf Immunzellen zu wirken, indem es die Zellproliferation anregt, die Differenzierung der Immunzellen beschleunigt und das Expressionsmuster weiterer Zytokine beeinflusst (LE VRAUX et al. 1993; PRABHAKAR et al. 1995; SAJJADI et al. 1996).

Bei einer eingesetzten Konzentration des *Coffea praeparata* von 0,1ml/ml findet nahezu keine Expression mehr statt. Die Koffeinkonzentration entspricht hier 0,2 mg/ml und liegt bereits im toxischen Niveau (HORRIGAN et al. 2004, 2006).

Auch bei der Konzentrationsverringering auf 0,01 ml/ml liegt der Koffeingehalt im Bereich des beginnenden toxischen Effektes auf die Zellen. Interessant ist die Herabregulierung des TNF- $\alpha$  durch *Coffea praeparata* bei den niedrigsten Konzentrationen. 0,01  $\mu$ l/ml entspricht 0,02 ng/ml Koffein. In dieser Konzentration wurde auch in anderen Studien eine

Verminderung der TNF- $\alpha$  Expression dargestellt (VAN FURTH et al. 1995; SHIN et al. 2000; HARRIGAN et al. 2004). Die dort festgestellten Ergebnisse wurden für das Schwein in dem hier gewählten Versuchsaufbau bestätigt. Eine anti-inflammatorische Wirkung kann deswegen für die Herabregulation des TNF- $\alpha$  angenommen werden.

## **5.9 Gedanken über den Einsatz von Koffein in der Tiermedizin**

In Anbetracht der Vielzahl an Auswirkungen von Koffein auf den Organismus gab und gibt es diverse Debatten über die generellen Konsequenzen/Folgeerscheinungen von Koffein auf die Gesundheit des Menschen und des Tieres. Die intensivsten Diskussionen ergeben sich in der Kardiologie, jedoch verdichten sich die Hinweise, dass Koffein und deren Methylxanthinmetaboliten ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf das Immunsystem ausüben können (JAMES 2004; ZIEGELSTEIN 2004).

Aufgrund der Bedeutung des Adenosins für den Körper hat auch Koffein eine große Anzahl zentraler und peripherer pharmakologischer Wirkungen, die auf dem Antagonismus zu Adenosin beruhen. Auf die Bronchialmuskulatur wirken die Methylxanthine Koffein und dessen Derivate relaxierend und daher antiasthmatisch (LÖSCHER et al. 1997).

Eine Stimulation der Herzmuskulatur bewirkt eine erhöhte Herzfrequenz, eine verstärkte Durchblutung der Organe und eine Änderung des peripheren Gefäßwiderstandes. Die Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur und die Zwerchfellkontraktilität nehmen zu, was sich positiv auf die Atemfunktion auswirkt (FREDHOLM 1988). Demgegenüber nimmt die Relaxation der glatten Muskulatur zu. Die Diurese der Nieren wird ebenfalls erhöht (ARNAUD 1987). Durch den Antagonismus zu Adenosin wird der durch A<sub>2</sub>AR vermittelte hemmende Effekt des Adenosins auf die Dopaminaffinität aufgehoben, was einer indirekten fördernden Wirkung entspricht (FREDHOLM et al. 2005).

Koffein hebt die durch Adenosin ausgelöste Hemmung der Neuromediator-Ausschüttung via A<sub>1</sub>R auf, so dass es nach einer Koffeingabe zur vermehrten Ausschüttung exzitatorischer Neuromediatoren kommt (FREDHOLM et al. 2005). Die CO<sub>2</sub>-Empfindlichkeit des Atemzentrums wird erhöht und dadurch das Atemminutenvolumen gesteigert. Koffein bedingt eine Stimulation des sympathischen Nervensystems. Dies führt zu einem Anstieg der

Catecholamine Epinephrin und Norepinephrin (GRAHAM u. SPRIET 1995; GRAHAM et al. 2000). Es konnte eine Steigerung des Cortisolspiegels im Plasma nachgewiesen werden (LAURENT et al. 2000). Zusätzlich zu der direkten Beeinflussung der Immunzellen durch Koffein können durch diese zentralnervösen und organischen Effekte, etwa auf das Herz-Kreislauf-System, weitere Auswirkungen auf die Funktion und die Immunzellwanderung erfolgen (BISHOP et al. 2005).

Wenn man die Wirkungsdauer des Koffeins richtig einschätzen will, muss man bedenken, dass die Halbwertszeit von Koffein allein kein Kriterium hierfür sein kann, da neben Koffein auch seine Metabolite pharmakologische Wirkung vermitteln können. Diese entstehen durch einen Abbau in der Leber. Die Beeinflussungen des Immunsystems durch diese Metabolite rücken erst nach und nach in das Blickfeld der Öffentlichkeit. Der Hauptmetabolit des Koffeins ist das Paraxanthin. Für diesen Metaboliten konnte jüngst eine Beeinflussung des Immunsystems bewiesen werden. Die Auswirkungen entsprechen denen von Koffein (HORRIGAN et al. 2006). Die immunmodulatorischen Wirkungen von Theophyllin sind länger bekannt. Es wird seit Jahren gezielt für die Behandlung von Asthma eingesetzt. Auch in der Veterinärmedizin ist der Einsatz von Theophyllin als Bronchodilatator unumstritten und eines der wichtigsten zur Behandlung der COPD (chronic obstructive pulmonary disease) und zur Behandlung der chronischen lymphoischen Leukämie (BASU u. MITRA BASU 2000). Über die Wirkung von Theobromin gibt es bislang nur wenige Erkenntnisse, die aber auf eine ähnliche Wirkung wie Koffein hindeuten, wenn auch schwächer in ihrer Ausprägung (CHOROSTOWSKA-WYNIMKO et al. 2004).

Bei der Beurteilung des Medikamentes muss berücksichtigt werden, dass der Effekt von Koffein bei Langzeitdistribution ein anderer sein kann, als bei einmaliger Applikation. Es kommt beim Koffein zu einer Toleranzentwicklung, die zu einer veränderten pharmakologischen Wirkungsweise führen kann. Der Toleranzeffekt ist für das Herz-Kreislauf-System dargestellt (FREDHOLM et al. 1999), für die immunologischen Funktionen jedoch nur spärlich untersucht. Bei der Betrachtung des Koffeins als Langzeittherapeutikum oder Prophylaktikum darf nicht aus den Augen gelassen werden, dass eine Langzeitexposition des Organismus mit Koffein (1-2 Wochen) in einer Hochregulation der A<sub>2a</sub>R resultiert. Die vermehrte Expression von A<sub>2a</sub>R führt dazu, dass der Adenosineinfluss auf die Zielzelle zunimmt und somit die anti-inflammatorische Wirkung zusätzlich verstärkt wird (VARANI et



al. 2005). Die Daten aus den Tierversuchen zeigen erste Ansätze einer Verstärkung der anti-inflammatorischen Wirkung.

Ein Toleranzverhalten ist für den Einsatz als Medikament von Bedeutung, da diese Gedanken in die Applikationsstrategie mit einfließen sollten. Bei der Betrachtung von bereits existierenden Studien sollte darauf geachtet werden, ob es sich um eine einmalige oder eine chronische Gabe des Koffeins handelt. Unterschiedliche Ergebnisse von Reaktionen können damit erklärt werden. Die gängige Lehrbuchmeinung ist, dass Koffein die meisten, wenn nicht gar alle Effekte über den Antagonismus zu Adenosin vermittelt. Wie Fredholm et al. (1990) zeigen konnte, hat Koffein das Potential, selbst in niedrigsten Konzentrationen mit allen 4 Adenosinrezeptoren zu interagieren. Des Weiteren wurde mehrfach postuliert, dass die Hemmung der cAMP-PDE nur mit Konzentrationen erreicht wird, die jenseits der normalen Aufnahme über Kaffee oder der gängigen pharmazeutischen Produkte sind (MANDEL 2002). In Bezug auf die Auswirkungen auf das Immunsystem lassen aber die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit bereits vorher veröffentlichten Publikationen vermuten, dass die Hemmung der PDE von entscheidender Bedeutung für die Auswirkungen des Koffein sind. Adenosin vermittelt, wie im Literaturteil dargestellt, anti-inflammatorische Effekte. Wenn nun Koffein ein Antagonist zu Adenosin ist, kann man annehmen, dass es zu einer Hemmung des anti-inflammatorischen Effektes des Adenosins kommt, was sich letzten Endes in einem pro-inflammatorischen Effekt niederschlagen könnte. Jedoch zeigen die Ergebnisse klar einen anti-inflammatorischen Effekt auf. Horrigan et al. (2004) konnten zeigen, dass es zu einem deutlichen Anstieg des cAMP in der Zelle nach Koffeingabe kommt. Des Weiteren konnten sie viele der von Koffein induzierten Wirkungen durch hochspezifische cAMP-Antagonisten (Rp-8-Br-cAMP) blockieren. Bis dato wurden 44 verschiedene PDE-Proteine identifiziert (CASTRO et al. 2005), die eine Vielzahl von Strukturen und Funktionen erfüllen. Um die Rolle des Koffeins als PDE mit anderen schon bekannten PDE-Hemmern zu vergleichen, sind sicherlich noch weitere Studien notwendig. Wie im Literaturteil dargestellt, gibt es eine Vielzahl von Übertragungswegen, über die Adenosin mit der Zelle interagiert. Die Möglichkeit, dass Koffein auch über diese Wege wirkt, ist durchaus gegeben. Der A<sub>2a</sub>R ist zwar der wichtigste Adenosinrezeptor auf Immunzellen, jedoch nicht der einzige. Die Rolle Des A<sub>3</sub>R ist das Ziel jüngerer Studien (EZEAMUZIE 2001; BARNES 2003).

Das Potential anti-inflammatorisch zu wirken, wird nun auch vermehrt zur gezielten Behandlung von Krankheiten eingesetzt. Bei einigen vorklinischen Studien konnte Koffein bei einem Tierversuchsmodell (Nager) gegen den endotoxischen Schock die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen reduzieren (SUGIYAMA et al. 2001). Erste Ergebnisse einer neueren Studie zeigen einen positiven Effekt des Koffein auf eine experimentelle Autoimmunenzephalitis, bei der der Beginn und die Schwere der Enzephalitis deutlich reduziert werden kann (TSUTSUI et al. 2004). Diese Wirkung wird durch eine von Koffein ausgelöste Erhöhung der A1R-Expression im Gehirn erklärt. Durch diese Erhöhung kann Adenosin einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Zellen ausüben.

Die Idee des Einsatzes von Koffein als pharmakologische Substanz ist die der potentiellen Verstärkung anti-inflammatorischer Wirkungen anderer Medikamente. So konnte schon vor längerer Zeit ein positiver Einfluss von Koffein auf die Wirkung von Aspirin, Paracetamol, Indomethazin und Phenylputazon gezeigt werden (VINEGAR et al. 1976; MAREK 1985).

Es gibt viele Hinweise für die prophylaktische Wirkung von Koffein bei verschiedenen Erkrankungen. Prominentes Beispiel ist eine epidemiologische Studie aus dem Jahr 1988, bei der über 72.000 Personen untersucht wurden, bei denen die Prävalenz für Asthma reziprokproportional zum Level der konsumierten Kaffeemenge stand (PAGANO et al. 1988). Inwieweit dieser Effekt auf den bronchodilatatorischen Effekt oder auf die immunmodulierende Wirkung zurückzuführen ist, ist jedoch nicht untersucht worden. Weitere epidemiologische Studien haben den Einfluss von Kaffee auf die Entwicklung neuronaler Erkrankungen als Ziel gehabt. Die Ergebnisse deuten auf einen protektiven Effekt des Kaffees bezüglich Parkinson (SCHWARTZ u. WEISS 1992) und Alzheimer (MAIA u. DE MENDONCA 2002) hin. Bei beiden Krankheiten spielen eine unangebrachte Mikrogliaaktivität und neuronale Entzündungen eine wesentliche Rolle für den Krankheitsverlauf (ROZEMULLER et al. 2005). So ist es möglich, dass Koffein die protektiven Effekte über die anti-inflammatorische Wirkung vermittelt.

## **5.10 Konklusion und Ausblick: Einsatz von *Coffea praeparata* in der Tiermedizin**

Viele der hier gezeigten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Koffein als alleiniger Wirkungsträger und damit als Referenz für den therapeutischen Inhaltsstoff von *Coffea praeparata* nicht korrekt ist. Angenommen wurden vergleichbare Ergebnisse der jeweiligen Applikationsformen, *per oral* und *per injectionem*. Die Unterschiede wurden eher zwischen den Applikationsarten, auch aufgrund der unterschiedlichen Dosierung, erwartet.

Die durch *Coffea praeparata* induzierten Wirkungen unterscheiden sich von denen der Reinsubstanz Koffein. Teilweise sind homologe Tendenzen darzustellen, welche jedoch bei der Reinsubstanz nicht so ausgeprägt sind. Teilweise entfaltet *Coffea praeparata* eine immunmodulatorische Wirkung, wohingegen die Reinsubstanz in derselben Konzentration an Koffein keine nachweisbaren Effekte aufweist. Dass *Coffea praeparata* als Decoctum mehr Wirkstoffe als nur Koffein beinhaltet, liegt nahe. Andere pharmakologisch wirksame Substanzen, wie auch die Wechselwirkung zwischen diesen im Decoctum, führen so bei den hier eingesetzten Konzentrationen zu einem ausgeprägten immunmodulatorischen Muster. Bezüglich der Applikationsform und Dosis ergaben sich Unterschiede. *Coffea praeparata* scheint wie Koffein eine sehr gute orale Bioverfügbarkeit zu besitzen. Die orale Applikationsform wies die signifikantesten Ergebnisse auf. Die Frage der Menge des einzusetzenden Medikamentes muss weiter untersucht werden, richtet sich jedoch neben den immunologischen Effekten vor allen Dingen nach der Praktikabilität der Gabe. Andere Wirkungen des *Coffea praeparata*, wie ein gesteigerter Appetit, positive Wirkungen auf das renale, endokrinologische, gastrointestinale, Herz-Kreislauf und insbesondere auf das respiratorische System, dürfen in Anbetracht der positiven Wirkungen, die Koffein ausübt (ARUNA 1997), durchaus postuliert werden.

Aufzuzeigen, dass *Coffea praeparata* wie auch Koffein beim Schwein überhaupt einen Effekt auf die Immunantwort hat, war Ziel dieser Studie. Die größte immunologische Modulation wurde bei der höher eingesetzten Dosierung erzielt. Wie zu erwarten, ergaben sich bei Langzeitadministration Gewöhnungseffekte, welche mit einem Höherregulieren der Adenosinrezeptoren zu erklären sind (HORRIGAN et al. 2004, 2006). Andere Effekte wurden erst nach mehrmaliger Gabe deutlich. Hier könnte der rezeptorunabhängige Wirkungsweg

über die cAMP eine Rolle spielen. Auch darf man nicht außer Acht lassen, dass weitere pharmakologisch wirksame Substanzen in *Coffea praeparata* enthalten sind.

## 6 Zusammenfassung

Peter Dziallas      **Prüfung der immunmodulatorischen Wirkung von  
Coffea praeparata und Koffein**

Koffein ist eine der am häufigsten konsumierten pharmakologisch wirksamen Substanzen. In Genussmitteln ist es weit verbreitet. Mit der Zeit wurden seine Wirkungsmechanismen und Auswirkungen für die unterschiedlichen Organsysteme erforscht und so auch für therapeutische Zwecke nutzbar gemacht. Der Einsatz von koffeinhaltigen Arzneien und weiterer Agonisten/Antagonisten seines wichtigsten Rezeptors, des Adenosinrezeptors, steigt stetig. Dies gilt auch für die Tiermedizin. Medikamente, die Koffein oder dessen Metabolite enthalten, werden bei Erkrankungen der Atemwege, bei Durchfall, allgemeinen Störungen des Allgemeinbefindens, Fressunlust, Kreislaufstörungen oder bei fieberhaften Erkrankungen eingesetzt. Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss einer Koffeinapplikation und der Applikation von *Coffea praeparata*, eines Decoctums aus *Coffea arabica tosta*, für das Immunsystem des Schweins zu untersuchen. Dabei lag ein Hauptaugenmerk darauf, ob Koffein der pharmakologisch wirksame Hauptbestandteil von *Coffea praeparata* ist und zu vergleichbaren Ergebnissen wie Koffein in Reinsubstanz führt.

Hierzu wurden unterschiedliche Aspekte der Leukozytenfunktion und deren Beeinflussung durch *Coffea praeparata* und Koffein näher untersucht. Da Koffein einen seiner Wirkungswege über die Antagonisierung der Adenosinrezeptoren (insbesondere A2a) entfaltet, wurde dargestellt, dass der Adenosinrezeptor Typ A2a auf porzinen Immunzellen exprimiert wird. Die Untersuchung des Zellbildes lieferte das Ergebnis, dass *Coffea praeparata* und Koffein in der Lage sind, die Monozytenzellzahl und die Anzahl der neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes bei mehrmaliger Applikation zu steigern. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der Monozyten am Blut um das 3-fache gesteigert, die absolute Menge der Monozyten stieg sogar um das 4-fache. Die L-Selektin-Produktion wurde als Marker für die Anheftung an die Zellwand genutzt. *Coffea praeparata* steigerte die Expression von L-Selektinen ex vivo signifikant um 17 %; dieser Effekt war bei Langzeitadministration allerdings nicht mehr nachweisbar. Auf die Diapedese, gemessen mittels Transmigrationssays, hatten jedoch sowohl *Coffea praeparata* als auch Koffein

keinen nachweisbaren Effekt. *Coffea praeparata* und Koffein führten jedoch zu einer verstärkten Proliferation von mononukleären Zellen sowohl nach einmaliger, wie auch nach mehrmaliger Gabe. Um die Leukozytenfunktion nach Gabe von *Coffea praeparata* und Koffein darzustellen, wurde die Fähigkeit der Zellen, Phagozytose zu betreiben, geprüft. Nach einmaliger Gabe von *Coffea praeparata* zeigte sich eine Reduzierung der Phagozytoseleistung um 38 %, bei Koffein wurde diese Reduzierung nur für die Menge der aufgenommenen Bakterien erreicht. Dieser Effekt war nach mehrmaliger Applikation nicht mehr nachzuweisen. Um die Art der modulatorischen Wirkungen besser einschätzen zu können, wurde die Genexpression einiger Enzyme und Zytokine nach Gabe von *Coffea praeparata* von gemessen. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Genexpression von Prostaglandin-G/H-Synthase- 2 um das 4-fache und TNF- $\alpha$  um 38 %. Die Expression von IL-6 und Arachidonat-5-Lipoxygenase wurde nicht beeinflusst.

Es zeigte sich, dass Koffein und *Coffea praeparata* in der Ausprägung ihrer Wirkungsweisen unterschiedlich waren. Teilweise waren homologe Tendenzen und Ergebnisse darzustellen. Teilweise entfaltete *Coffea praeparata* eine immunmodulatorische Wirkung, wohingegen die Reinsubstanz in derselben Konzentration an Koffein keine nachweisbaren Effekte aufwies. Dies führt zu der Erkenntnis, dass, bezogen auf das Immunsystem, Koffein alleine für die Wirkungsweise des *Coffea praeparata* nicht in Betracht kommt, sondern vielmehr die Wechselwirkungen der Zusammensetzung des Decoctums, in der eine Steigerung der Koffeinwirkung zu liegen scheint. Viele humanmedizinische Studien arbeiteten ebenfalls nicht mit der Reinsubstanz Koffein, sondern mit Kaffee, was der Tatsache geschuldet ist, dass Kaffee einen weit verbreiteten Einsatz erfährt.

Im Tierversuch und den *In-vitro*-Versuchen konnte aufgezeigt werden, dass *Coffea praeparata*, und in schwächerer Ausprägung Koffein, in der Lage ist, einige Bereiche der Leukozytenfunktion bei gegebenen Dosierungen zu beeinflussen. Viele dieser Beeinflussungen waren nach einmaliger Gabe ausgeprägter oder konnten nach Langzeitadministration nicht mehr nachgewiesen werden, wie etwa die signifikant gesteigerte L-Selektin-Expression um 17 % oder die signifikant verminderte Phagozytoseleistung. Es kann geschlussfolgert werden, dass sich bei Langzeitadministration Gewöhnungseffekte ergaben. Andere Auswirkungen verstärkten sich mit Dauer der Gabe, hier insbesondere die Erhöhung der Monozytenzahlen, die Steigerung der Granulozytenzahlen im Blut und der

hemmende Effekt auf die Produktion von TNF- $\alpha$  und PGHS-2. Die hier gewonnenen Erkenntnisse decken sich mit Untersuchungen, welche für die Maus und den Menschen bereits bekannt sind. *Coffea praeparata* und Koffein als Reinsubstanz scheint in Homologie aller bisher erfolgten Studien, seine protektiven Effekte über die anti-inflammatorische Wirkung zu vermitteln. Es wäre wünschenswert, wenn weitere pharmakologisch wirksame Inhaltsstoffe des *Coffea praeparata* auf ihre Auswirkungen auf das Immunsystem untersucht werden würden, um so die genauen Wirkungsmechanismen zu charakterisieren. Es ist damit zu rechnen, dass der Einsatz von *Coffea praeparata* und anderer koffeinhaltiger Substanzen in der Veterinärmedizin weiter zunimmt.

## 7 Summary

Peter Dziallas      **Examination of the immunomodulatory effect of  
*Coffea praeparata* and caffeine**

Caffeine is one of the most commonly consumed pharmacologically active substances. It has a widespread distribution in luxury foods. In the course of time, its mechanisms of action and implications for a variety of organ systems have been investigated and harnessed for therapeutic purposes. The use of caffeine-containing drugs and other agonists/antagonists of its main receptor, the adenosine receptor, increase steadily. This also applies to veterinary medicine. The aim of this study was to investigate the effects of caffeine application and the application of *Coffea praeparata*, a Decoctums from *Coffea arabica tosta* on the porcine immune system. One major focus was to identify whether caffeine is the main pharmacologically active component of *Coffea praeparata* resulting in comparable results between both substances. Different aspects of leukocyte function and their possible modulation by *Coffea praeparata* and caffeine were examined. Since caffeine unfolds some of its effect via the antagonism of the adenosine receptors (particularly A2a), it was demonstrated in this study by flow cytometry that the adenosine A2a receptor is expressed on porcine immune cells. The investigation of blood cell counts revealed that *Coffea praeparata* and caffeine are able to increase peripheral blood monocyte and neutrophile numbers after repeated application in vivo. Percentages of monocytes in peripheral blood were increased about 3 fold, the numbers of circulating monocytes increased 4-fold. L-selectin expression was used as a marker for the attachment to the cell wall. *Coffea praeparata* significantly increased the expression of L-selectin *ex vivo* by 17%. This effect was no longer seen after long-term administration in vivo. However, both *Coffea praeparata* and caffeine had no detectable effect on the in vitro migration of PMN's. After single and repeated administration of *Coffea praeparata* and caffeine in vivo, mononuclear cells displayed an enhanced proliferation response towards stimulation with ConA. *Coffea praeparata* resulted in a 38% reduced phagocytosis capacity after single administration. Caffeine administration did not affect the percentage of phagocytosing neutrophils but reduced the amount of phagocytosed bacteria per cell. Both effects were no longer detectable after repeated application. In order to



address the nature of the modulatory effects, mRNA expression of selected enzymes and cytokines of blood leukocytes was measured after administration of *Coffea praeparata*. This resulted in a significant reduction of prostaglandin G/H synthase-2 mRNA expression (4 times less) and a reduction of TNF- $\alpha$  mRNA expression by 38%. The mRNA expression of IL-6 and arachidonate 5-lipoxygenase was not affected.

It could be shown that caffeine and *Coffea praeparata* acted differently regarding effectiveness and modes of action. Partially homologous trends and results could be observed. *Coffea praeparata* exerted some immunomodulatory effects, whereas the pure substance, caffeine, had no detectable effects. This leads to the assumption that the observed immunomodulatory effects are due to the combined action and interactions between different components of the Decoctum.

The *in vivo/ex vivo* experiments and some *in vitro* experiments of this study demonstrated that *Coffea praeparata*, and to a weaker extend, caffeine, can have influences on selected leukocyte functions at given dosages. Many of these effects were more pronounced after a single dose and could no longer be detected after long-term administration (e.g. increased L-selectin expression or decreased phagocytosis). The reason for this may be due to habituation effects during long-term administration. On the other hand, some effects increased with prolonged administration, especially the increase in blood monocyte and neutrophile cell counts, and the inhibitory effects on leukocytes TNF- $\alpha$  and PGHS-2 mRNA expression. The results of this porcine study are consistent with studies in the human and murine system.. In homology to these previous studies *Coffea praeparata*, and to a lesser extent caffeine, seems to convey its protective effects in pigs by favoring more anti-inflammatory pathways.

For a better characterization of the precise mechanisms it would be desirable to evaluate further pharmacologically active ingredients of *Coffea praeparata*.

It is anticipated that the use of *Coffea praeparata* and other caffeinated (or their derivatives such as theophylline) substances in veterinary medicine continues to grow.

## 8 Referenzen

ABBRACCHIO, M. P. u. F. CATTABENI (1999):

Brain adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases.

Ann N Y Acad Sci 890, 79-92

ADAIR, T. H., R. COTTEN, J. W. GU, J. S. PRYOR, K. R. BENNETT, M. R. MCMULLAN, P. MCDONNELL u. J. P. MONTANI (2005):

Adenosine infusion increases plasma levels of VEGF in humans.

BMC Physiol 5, 10

AIRAS, L., J. HELLMAN, M. SALMI, P. BONO, T. PUURUNEN, D. J. SMITH u. S. JALKANEN (1995):

CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73.

J Exp Med 182, 1603-1608

ALBRECHT, H., L. B. SCHOOK u. C. V. JONGENEEL (1995):

Nuclear migration of NF-kappa B correlates with TNF-alpha mRNA accumulation.

J Inflamm 45, 64-71

ALDRICH, M. B., W. CHEN, M. R. BLACKBURN, H. MARTINEZ-VALDEZ, S. K. DATTA u. R. E. KELLEMS (2003):

Impaired germinal center maturation in adenosine deaminase deficiency.

J Immunol 171, 5562-5570

AMBROSIO, A. F., J. O. MALVA, A. P. CARVALHO u. C. M. CARVALHO (1997):

Inhibition of N-,P/Q- and other types of Ca<sup>2+</sup> channels in rat hippocampal nerve terminals by the adenosine A1 receptor.

Eur J Pharmacol 340, 301-310

APASOV, S., J. F. CHEN, P. SMITH u. M. SITKOVSKY (2000a):

A(2A) receptor dependent and A(2A) receptor independent effects of extracellular adenosine on murine thymocytes in conditions of adenosine deaminase deficiency.

Blood 95, 3859-3867

APASOV, S. G., J. F. CHEN, P. T. SMITH, M. A. SCHWARZSCHILD, J. S. FINK u. M. V. SITKOVSKY (2000b):

Study of A(2A) adenosine receptor gene deficient mice reveals that adenosine analogue CGS 21680 possesses no A(2A) receptor-unrelated lymphotoxicity.

Br J Pharmacol 131, 43-50

ARANDA, J. V., W. GORMAN, H. BERGSTEINSSON u. T. GUNN (1977):

Efficacy of caffeine in treatment of apnea in the low-birth-weight infant.

J Pediatr 90, 467-472

ARNAUD, M. J. (1987):

The pharmacology of caffeine.

Prog Drug Res 31, 273-313

ARUNA, A. S. (1997):

Caffeine: fact and fallacy.

Global publishing network, New Orleans

BARNES, P. J. (2003):

Theophylline: new perspectives for an old drug.

Am J Respir Crit Care Med 167, 813-818

BASU, S. u. R. MITRA BASU (2000):

Theophylline as a therapy for chronic lymphocytic leukemia: a case report and review of literature.

Haematologia (Budap) 30, 225-227

BECKER, D., S. J. BEEBE u. M. HERLYN (1990):

Differential expression of protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase in normal human melanocytes and malignant melanomas.

Oncogene 5, 1133-1139

BENOWITZ, N. L. (1990):

Clinical pharmacology of caffeine.

Annu Rev Med 41, 277-288

BISHOP, N. C., C. FITZGERALD, P. J. PORTER, G. A. SCANLON u. A. C. SMITH (2005):

Effect of caffeine ingestion on lymphocyte counts and subset activation in vivo following strenuous cycling.

Eur J Appl Physiol 93, 606-613

BLACKBURN, M. R., S. K. DATTA, M. WAKAMIYA, B. S. VARTABEDIAN u. R. E. KELLEMS (1996):

Metabolic and immunologic consequences of limited adenosine deaminase expression in mice.

J Biol Chem 271, 15203-15210

BLANCHARD, J. u. S. J. SAWERS (1983):

The absolute bioavailability of caffeine in man.

Eur J Clin Pharmacol 24, 93-98

BLITEK, A., A. WACLAWIK, M. M. KACZMAREK, T. STADEJEK, Z. PEJSAK u. A. J. ZIECIK (2006):

Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in the porcine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy.

Reprod Domest Anim 41, 251-257

BONATI, M., R. LATINI, F. GALLETI, J. F. YOUNG, G. TOGNONI u. S. GARATTINI (1982):

Caffeine disposition after oral doses.

Clin Pharmacol Ther 32, 98-106

BOUMA, M. G., T. M. JEUNHOMME, D. L. BOYLE, M. A. DENTENER, N. N. VOITENOK, F. A. VAN DEN WILDENBERG u. W. A. BUURMAN (1997):

Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors.

J Immunol 158, 5400-5408

BOUMA, M. G., R. K. STAD, F. A. VAN DEN WILDENBERG u. W. A. BUURMAN (1994):

Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes.

J Immunol 153, 4159-4168

BOUMA, M. G., F. A. VAN DEN WILDENBERG u. W. A. BUURMAN (1996):

Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells.

Am J Physiol 270, C522-529

BROMELOW, K. V., W. HIRST, R. L. MENDES, A. R. WINKLEY, I. E. SMITH, M. E. O'BRIEN u. B. E. SOUBERBIELLE (2001):

Whole blood assay for assessment of the mixed lymphocyte reaction.

J Immunol Methods 247, 1-8

BROUSSAS, M., P. CORNILLET-LEFEBVRE, G. POTRON u. P. NGUYEN (1999):

Inhibition of fMLP-triggered respiratory burst of human monocytes by adenosine: involvement of A3 adenosine receptor.

J Leukoc Biol 66, 495-501

BROUSSAS, M., P. CORNILLET-LEFEBVRE, G. POTRON u. P. NGUYEN (2002):

Adenosine inhibits tissue factor expression by LPS-stimulated human monocytes: involvement of the A3 adenosine receptor.

Thromb Haemost 88, 123-130

BURNSTOCK, G. (2004):

Introduction: P2 receptors.

Curr Top Med Chem 4, 793-803

BURNSTOCK, G. u. M. WILLIAMS (2000):

P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential.

J Pharmacol Exp Ther 295, 862-869

BUSSE, W. W. (1998):

Leukotrienes and inflammation.

Am J Respir Crit Care Med 157, S210-213; discussion S247-218

BUTLER, J. J., J. S. MADER, C. L. WATSON, H. ZHANG, J. BLAY u. D. W. HOSKIN (2003):

Adenosine inhibits activation-induced T cell expression of CD2 and CD28 co-stimulatory molecules: role of interleukin-2 and cyclic AMP signaling pathways.

J Cell Biochem 89, 975-991

CADIEUX, J. S., P. LECLERC, M. ST-ONGE, A. A. DUSSAULT, C. LAFLAMME, S. PICARD, C. LEDENT, P. BORGEAT u. M. POULIOT (2005):

Potential of neutrophil cyclooxygenase-2 by adenosine: an early anti-inflammatory signal.

J Cell Sci 118, 1437-1447

CARR, C. S., R. J. HILL, H. MASAMUNE, S. P. KENNEDY, D. R. KNIGHT, W. R. TRACEY u. D. M. YELLON (1997):

Evidence for a role for both the adenosine A1 and A3 receptors in protection of isolated human atrial muscle against simulated ischaemia.

Cardiovasc Res 36, 52-59

CASSATELLA, M. A. (1999):

Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound.

Adv Immunol 73, 369-509

CASTRO, A., M. J. JEREZ, C. GIL u. A. MARTINEZ (2005):

Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in immunomodulatory responses: advances in the development of specific phosphodiesterase inhibitors.

Med Res Rev 25, 229-244

CHOROSTOWSKA-WYNIMKO, J., E. SKOPINSKA-ROZEWSKA, E. SOMMER, E. ROGALA, P. SKOPINSKI u. E. WOJTASIK (2004):

Multiple effects of theobromine on fetus development and postnatal status of the immune system.

Int J Tissue React 26, 53-60

CLANCY, J. P., F. E. RUIZ u. E. J. SORSCHER (1999):

Adenosine and its nucleotides activate wild-type and R117H CFTR through an A2B receptor-coupled pathway.

Am J Physiol 276, C361-369

CORBIN, J. D., T. R. SODERLING u. C. R. PARK (1973):

Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. I. Preliminary characterization of the adipose tissue enzyme in crude extracts.

J Biol Chem 248, 1813-1821

CRONSTEIN, B. N. (1994):

Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent.

J Appl Physiol 76, 5-13

CRONSTEIN, B. N., L. DAGUMA, D. NICHOLS, A. J. HUTCHISON u. M. WILLIAMS (1990):

The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O<sub>2</sub> generation, respectively.

J Clin Invest 85, 1150-1157

CRONSTEIN, B. N., R. I. LEVIN, M. PHILIPS, R. HIRSCHHORN, S. B. ABRAMSON u. G. WEISSMANN (1992):

Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors.

J Immunol 148, 2201-2206

CUNNINGHAM, H. M. (1968):

Effect of caffeine on nitrogen retention, carcass composition, fat mobilization and the oxidation of C<sup>14</sup>-labeled body fat in pigs.

J Anim Sci 27, 424-430

DAY, Y. J., L. HUANG, H. YE, J. LINDEN u. M. D. OKUSA (2005):

Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages.

Am J Physiol Renal Physiol 288, F722-731

DAY, Y. J., M. A. MARSHALL, L. HUANG, M. J. MCDUFFIE, M. D. OKUSA u. J. LINDEN (2004):

Protection from ischemic liver injury by activation of A2A adenosine receptors during reperfusion: inhibition of chemokine induction.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 286, G285-293

DE ROOIJ, J., H. REHMANN, M. VAN TRIEST, R. H. COOL, A. WITTINGHOFER u. J. L. BOS (2000):

Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs.

J Biol Chem 275, 20829-20836

DRURY, A. N. u. A. SZENT-GYORGYI (1929):

The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart.

J Physiol 68, 213-237

DUNWIDDIE, T. V. u. S. A. MASINO (2001):

The role and regulation of adenosine in the central nervous system.

Annu Rev Neurosci 24, 31-55

EDWARDS, S. W. (1994):

Biochemistry and physiology of the neutrophil.

Cambridge University Press, Cambridge [England] ; New York

EICHLER, O. (1976):

Kaffee und Coffein.

Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York



ELTZSCHIG, H. K., J. C. IBLA, G. T. FURUTA, M. O. LEONARD, K. A. JACOBSON, K. ENJYOJI, S. C. ROBSON u. S. P. COLGAN (2003):

Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors.

J Exp Med 198, 783-796

EMMENDORFFER, A., M. HECHT, M. L. LOHMANN-MATTHES u. J. ROESLER (1990):

A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123.

J Immunol Methods 131, 269-275

EPPELL, B. A., A. M. NEWELL u. E. J. BROWN (1989):

Adenosine receptors are expressed during differentiation of monocytes to macrophages in vitro. Implications for regulation of phagocytosis.

J Immunol 143, 4141-4145

EZEAMUZIE, C. I. (2001):

Involvement of A(3) receptors in the potentiation by adenosine of the inhibitory effect of theophylline on human eosinophil degranulation: possible novel mechanism of the anti-inflammatory action of theophylline.

Biochem Pharmacol 61, 1551-1559

FANTONE, J. C. u. P. A. WARD (1985):

Polymorphonuclear leukocyte-mediated cell and tissue injury: oxygen metabolites and their relations to human disease.

Hum Pathol 16, 973-978

FASANO, M. B., J. D. WELLS u. C. E. MCCALL (1998):

Human neutrophils express the prostaglandin G/H synthase 2 gene when stimulated with bacterial lipopolysaccharide.

Clin Immunol Immunopathol 87, 304-308

FEOKTISTOV, I., A. E. GOLDSTEIN u. I. BIAGGIONI (1999):

Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase in adenosine A2B receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells.

Mol Pharmacol 55, 726-734

FEOKTISTOV, I., A. E. GOLDSTEIN, S. RYZHOV, D. ZENG, L. BELARDINELLI, T. VOYNO-YASENETSKAYA u. I. BIAGGIONI (2002):

Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation.

Circ Res 90, 531-538

FLAMAND, N., S. BOUDREAULT, S. PICARD, M. AUSTIN, M. E. SURETTE, H. PLANTE, E. KRUMP, M. J. VALLEE, C. GILBERT, P. NACCACHE, M. LAVIOLETTE u. P. BERGEAT (2000):

Adenosine, a potent natural suppressor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils.

Am J Respir Crit Care Med 161, S88-94

FLEISHER, T. A. (1997):

Apoptosis.

Ann Allergy Asthma Immunol 78, 245-249; quiz 249-250

FONTEH, A. N., J. D. WINKLER, T. J. TORPHY, J. HERAVI, B. J. UNDEM u. F. H. CHILTON (1993):

Influence of isoproterenol and phosphodiesterase inhibitors on platelet-activating factor biosynthesis in the human neutrophil.

J Immunol 151, 339-350

FORMAN, H. J. u. M. TORRES (2002):

Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling.

Am J Respir Crit Care Med 166, S4-8

FORSYTHE, P. u. M. ENNIS (1999):

Adenosine, mast cells and asthma.

Inflamm Res 48, 301-307

FREDHOLM, B. B. (1978):

Effect of adenosine, adenosine analogues and drugs inhibiting adenosine inactivation on lipolysis in rat fat cells.

Acta Physiol Scand 102, 191-198

FREDHOLM, B. B. (1985):

On the mechanism of action of theophylline and caffeine.

Acta Med Scand 217, 149-153

FREDHOLM, B. B. (1988):

[Coffee, caffeine and the heart--heart disease].

Lakartidningen 85, 1869-1873

FREDHOLM, B. B. (1995):

Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine.

Pharmacol Toxicol 76, 93-101

FREDHOLM, B. B., I. J. AP, K. A. JACOBSON, K. N. KLOTZ u. J. LINDEN (2001):

International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors.

Pharmacol Rev 53, 527-552

FREDHOLM, B. B., I. J. AP, K. A. JACOBSON, J. LINDEN u. C. E. MULLER  
International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update.

Pharmacol Rev 63, 1-34

FREDHOLM, B. B., K. BATTIG, J. HOLMEN, A. NEHLIG u. E. E. ZVARTAU (1999):

Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use.

Pharmacol Rev 51, 83-133

FREDHOLM, B. B., J. F. CHEN, R. A. CUNHA, P. SVENNINGSSON u. J. M. VAUGEOIS (2005):

Adenosine and brain function.

Int Rev Neurobiol 63, 191-270

FREDHOLM, B. B., T. V. DUNWIDDIE, B. BERGMAN u. K. LINDSTROM (1984):

Levels of adenosine and adenine nucleotides in slices of rat hippocampus.

Brain Res 295, 127-136

FUHR, U., K. L. ROST, R. ENGELHARDT, M. SACHS, D. LIERMANN, C. BELLOC, P. BEAUNE, S. JANEZIC, D. GRANT, U. A. MEYER u. A. H. STAIB (1996):

Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations.

Pharmacogenetics 6, 159-176

GARRETT, R. G., GRISHAM, C.M. (2009):

Biochemistry.

Brooks/Cole, Boston MA

GERMACK, R. u. J. M. DICKENSON (2000):

Activation of protein kinase B by the A(1)-adenosine receptor in DDT(1)MF-2 cells.

Br J Pharmacol 130, 867-874

GESSI, S., K. VARANI, S. MERIGHI, E. ONGINI u. P. A. BOREA (2000):

A(2A) adenosine receptors in human peripheral blood cells.

Br J Pharmacol 129, 2-11

GRAEVE, L., M. BAUMANN u. P. C. HEINRICH (1993):

Interleukin-6 in autoimmune disease. Role of IL-6 in physiology and pathology of the immune defense.

Clin Investig 71, 664-671

GRAHAM, T. E., J. W. HELGE, D. A. MACLEAN, B. KIENS u. E. A. RICHTER (2000):

Caffeine ingestion does not alter carbohydrate or fat metabolism in human skeletal muscle during exercise.

J Physiol 529 Pt 3, 837-847

GRAHAM, T. E. u. L. L. SPRIET (1995):

Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine.

J Appl Physiol 78, 867-874

GRIFFIN, F. M., JR., J. A. GRIFFIN, J. E. LEIDER u. S. C. SILVERSTEIN (1975):

Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane.

J Exp Med 142, 1263-1282

GUTENSOHN, W., R. RESTA, Y. MISUMI, Y. IKEHARA u. L. F. THOMPSON (1995):

Ecto-5'-nucleotidase activity is not required for T cell activation through CD73.

Cell Immunol 161, 213-217

HAKONARSON, H. u. M. M. GRUNSTEIN (1998):

Regulation of second messengers associated with airway smooth muscle contraction and relaxation.

Am J Respir Crit Care Med 158, S115-122

HARISH, A., G. HOHANA, P. FISHMAN, O. ARNON u. S. BAR-YEHUDA (2003):

A3 adenosine receptor agonist potentiates natural killer cell activity.

Int J Oncol 23, 1245-1249

HASHIMOTO, E., K. KAGE, T. OGITA, T. NAKAOKA, R. MATSUOKA u. Y. KIRA (1994):

Adenosine as an endogenous mediator of hypoxia for induction of vascular endothelial growth factor mRNA in U-937 cells.

Biochem Biophys Res Commun 204, 318-324

HASKO, G. (2007):

Adenosine Receptors - Therapeutic aspects for inflammatory and immune disease.

Taylor & Francis, Boca Raton, FL

HASKO, G., E. A. DEITCH, C. SZABO, Z. H. NEMETH u. E. S. VIZI (2002):

Adenosine: a potential mediator of immunosuppression in multiple organ failure.

Curr Opin Pharmacol 2, 440-444

HASKO, G., J. LINDEN, B. CRONSTEIN u. P. PACHER (2008):

Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases.

Nat Rev Drug Discov 7, 759-770

HAVERSON, K. (2001):

Introduction.

Vet Immunol Immunopathol 80, 1-3

HAYNES, J., JR., J. ROBINSON, L. SAUNDERS, A. E. TAYLOR u. S. J. STRADA (1992):

Role of cAMP-dependent protein kinase in cAMP-mediated vasodilation.

Am J Physiol 262, H511-516

HERRERA, C., V. CASADO, F. CIRUELA, P. SCHOFIELD, J. MALLOL, C. LLUIS u. R. FRANCO (2001):

Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells.

Mol Pharmacol 59, 127-134

HERSHFIELD, M. S. (1998):

Adenosine deaminase deficiency: clinical expression, molecular basis, and therapy.

Semin Hematol 35, 291-298

HERSHFIELD, M. S. (2005):

New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency.

Eur J Immunol 35, 25-30

HIRT, W., T. NEBE u. C. BIRR (1994):

[Phagotest and Bursttest (Phagoburst), test kits for study of phagocyte functions].

Wien Klin Wochenschr 106, 250-252

HOFER, S., L. IVARSSON, P. STOITZNER, M. AUFFINGER, C. RAINER, N. ROMANI u. C. HEUFLER (2003):

Adenosine slows migration of dendritic cells but does not affect other aspects of dendritic cell maturation.

J Invest Dermatol 121, 300-307

HORRIGAN, L. A., J. P. KELLY u. T. J. CONNOR (2004):

Caffeine suppresses TNF-alpha production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway.

Int Immunopharmacol 4, 1409-1417

HORRIGAN, L. A., J. P. KELLY u. T. J. CONNOR (2006):

Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe?

Pharmacol Ther 111, 877-892

HOWARD, C. J. u. J. NAESSENS (1993):

Summary of workshop findings for cattle (tables 1 and 2).

Vet Immunol Immunopathol 39, 25-47

HUANG, S., S. APASOV, M. KOSHIBA u. M. SITKOVSKY (1997):

Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion.

Blood 90, 1600-1610

IANNONE, M. A., G. WOLBERG u. T. P. ZIMMERMAN (1989):

Chemotactic peptide induces cAMP elevation in human neutrophils by amplification of the adenylate cyclase response to endogenously produced adenosine.

J Biol Chem 264, 20177-20180

IKEDA, G. J., P. P. SAPIENZA, M. L. MCGINNIS, L. E. BRAGG, J. J. WALSH u. T. F. COLLINS (1982):

Blood levels of caffeine and results of fetal examination after oral administration of caffeine to pregnant rats.

J Appl Toxicol 2, 307-314

IUR'EVA, K. S., K. V. NEVSKAIA, A. N. DZIUMAN, O. P. IKKERT, V. V. IVANOV, I. V. SALTYKOVA, A. E. SAZONOV u. L. M. OGORODOVA (2014):

[Stimulation of adenosine receptors on myeloid cells enhance leukocyte migration at the site of burn injury].

Biomed Khim 60, 246-257

JACOBSEN, C. N., B. AASTED, M. K. BROE u. J. L. PETERSEN (1993):

Reactivities of 20 anti-human monoclonal antibodies with leucocytes from ten different animal species.

Vet Immunol Immunopathol 39, 461-466

JACOBSEN, K. A., GAO, Z.G. (2006):

Adenosine receptors as therapeutic targets.

Nature Review 5, 247-264

JAFARI, M. u. A. RABBANI (2000):

Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung.

Toxicology 149, 101-108

JAMES, J. E. (2004):

Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously.

Psychosom Med 66, 63-71

JANEWAY, C. A. (2002):

Immunologie.

Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg

KAMEOKA, J., R. ICHINOHASAMA, H. INOUE, J. YAMAMOTO, H. YOKOYAMA, Y. TOMIYA, M. YAMADA, K. ISHIZAWA, H. HARIGAE, T. SAWAI u. T. SASAKI (2006):



CD26, together with cell surface adenosine deaminase, is selectively expressed on ALK-positive, but not on ALK-negative, anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 47, 2181-2188

KANTAMALA, D., M. VONGSAKUL u. J. SATAYAVIVAD (1990):

The in vivo and in vitro effects of caffeine on rat immune cells activities: B, T and NK cells. *Asian Pac J Allergy Immunol* 8, 77-82

KAUPP, U. B. u. R. SEIFERT (2002):

Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82, 769-824

KHOA, N. D., M. C. MONTESINOS, A. B. REISS, D. DELANO, N. AWADALLAH u. B. N. CRONSTEIN (2001):

Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A(2A) receptors in human monocytic THP-1 cells. *J Immunol* 167, 4026-4032

KIMMEL, C. A., G. L. KIMMEL, C. G. WHITE, T. F. GRAFTON, J. F. YOUNG u. C. J. NELSON (1984):

Blood flow changes and conceptual development in pregnant rats in response to caffeine. *Fundam Appl Toxicol* 4, 240-247

KIZAKI, H., H. SHIMADA, F. OHSAKA u. T. SAKURADA (1988):

Adenosine, deoxyadenosine, and deoxyguanosine induce DNA cleavage in mouse thymocytes. *J Immunol* 141, 1652-1657

KIZAKI, H., K. SUZUKI, T. TADAKUMA u. Y. ISHIMURA (1990):

Adenosine receptor-mediated accumulation of cyclic AMP-induced T-lymphocyte death through internucleosomal DNA cleavage. *J Biol Chem* 265, 5280-5284

KNIGHT, D., X. ZHENG, C. ROCCHINI, M. JACOBSON, T. BAI u. B. WALKER (1997):

Adenosine A3 receptor stimulation inhibits migration of human eosinophils.

J Leukoc Biol 62, 465-468

KOHN, L. A., Q. L. HAO, R. SASIDHARAN, C. PAREKH, S. GE, Y. ZHU, H. K. MIKKOLA u. G. M. CROOKS Lymphoid priming in human bone marrow begins before expression of CD10 with upregulation of L-selectin.

Nat Immunol 13, 963-971

KOHN, Y., X. JI, S. D. MAWHORTER, M. KOSHIBA u. K. A. JACOBSON (1996):

Activation of A3 adenosine receptors on human eosinophils elevates intracellular calcium.

Blood 88, 3569-3574

KOSHIBA, M., H. KOJIMA, S. HUANG, S. APASOV u. M. V. SITKOVSKY (1997):

Memory of extracellular adenosine A2A purinergic receptor-mediated signaling in murine T cells.

J Biol Chem 272, 25881-25889

KRUMP, E., G. LEMAY u. P. BORGEAT (1996):

Adenosine A2 receptor-induced inhibition of leukotriene B4 synthesis in whole blood ex vivo.

Br J Pharmacol 117, 1639-1644

LACHANCE, M. P., C. MARLOWE u. W. J. WADDELL (1983):

Autoradiographic disposition of [1-methyl-14C]- and [2-14C]caffeine in mice.

Toxicol Appl Pharmacol 71, 237-241

LAURENT, D., K. E. SCHNEIDER, W. K. PRUSACZYK, C. FRANKLIN, S. M. VOGEL, M. KRSSAK, K. F. PETERSEN, H. W. GOFORTH u. G. I. SHULMAN (2000):

Effects of caffeine on muscle glycogen utilization and the neuroendocrine axis during exercise.

J Clin Endocrinol Metab 85, 2170-2175

LAUX, D. C., P. H. KLESIUS u. W. S. JETER (1973):

Suppressive effects of caffeine on the immune response of the mouse to sheep erythrocytes.

Proc Soc Exp Biol Med 144, 633-638

LE GUENNEC, J. C. u. B. BILLON (1987):

Delay in caffeine elimination in breast-fed infants.

Pediatrics 79, 264-268

LE MOINE, O., P. STORDEUR, L. SCHANDENE, A. MARCHANT, D. DE GROOTE, M. GOLDMAN u. J. DEVIERE (1996):

Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes.

J Immunol 156, 4408-4414

LE VRAUX, V., Y. L. CHEN, I. MASSON, M. DE SOUSA, J. P. GIROUD, I. FLORENTIN u. L. CHAUVELOT-MOACHON (1993):

Inhibition of human monocyte TNF production by adenosine receptor agonists.

Life Sci 52, 1917-1924

LEIBOVICH, S. J., J. F. CHEN, G. PINHAL-ENFIELD, P. C. BELEM, G. ELSON, A. ROSANIA, M. RAMANATHAN, C. MONTESINOS, M. JACOBSON, M. A. SCHWARZSCHILD, J. S. FINK u. B. CRONSTEIN (2002):

Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonists and endotoxin.

Am J Pathol 160, 2231-2244

LEONARD, E. J., A. SKEEL, P. K. CHIANG u. G. L. CANTONI (1978):

The action of the adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine, on phagocytic function of mouse macrophages and human monocytes.

Biochem Biophys Res Commun 84, 102-109

LEVINE, M. G., A. W. AHLBERG, A. MANN, M. P. WHITE, C. C. MCGILL, C. MENDES DE LEON, J. M. PIRIZ, D. WATERS u. G. V. HELLER (1999):

Comparison of exercise, dipyridamole, adenosine, and dobutamine stress with the use of Tc-99m tetrofosmin tomographic imaging.

J Nucl Cardiol 6, 389-396

LEWIS, C. E., R. LEEK, A. HARRIS u. J. O. MCGEE (1995):

Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages.

J Leukoc Biol 57, 747-751

LI, C., T. HA, L. LIU, W. BROWDER u. R. L. KAO (2000):

Adenosine prevents activation of transcription factor NF-kappa B and enhances activator protein-1 binding activity in ischemic rat heart.

Surgery 127, 161-169

LINDEN, J., T. THAI, H. FIGLER, X. JIN u. A. S. ROBEVA (1999):

Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells.

Mol Pharmacol 56, 705-713

LOKSHIN, A., T. RASKOVALOVA, X. HUANG, L. C. ZACHARIA, E. K. JACKSON u. E. GORELIK (2006):

Adenosine-mediated inhibition of the cytotoxic activity and cytokine production by activated natural killer cells.

Cancer Res 66, 7758-7765

LÖSCHER, W., F. UNGEMACH u. R. KROKER (1997):

Zentrale Analeptika.

In: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren

Parey, Hamburg, S.

LUDWIG, H. C., S. RAUSCH, K. SCHALLOCK u. E. MARKAKIS (1999):

Expression of CD 73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry.

Anticancer Res 19, 1747-1752

LUKASHEV, D. E., P. T. SMITH, C. C. CALDWELL, A. OHTA, S. G. APASOV u. M. V. SITKOVSKY (2003):

Analysis of A2a receptor-deficient mice reveals no significant compensatory increases in the expression of A2b, A1, and A3 adenosine receptors in lymphoid organs.

Biochem Pharmacol 65, 2081-2090

MACKENZIE, W. M., D. W. HOSKIN u. J. BLAY (2002):

Adenosine suppresses alpha(4)beta(7) integrin-mediated adhesion of T lymphocytes to colon adenocarcinoma cells.

Exp Cell Res 276, 90-100

MAIA, L. u. A. DE MENDONCA (2002):

Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease?

Eur J Neurol 9, 377-382

MALONEY, C. G., W. A. KUTCHERA, K. H. ALBERTINE, T. M. MCINTYRE, S. M. PRESCOTT u. G. A. ZIMMERMAN (1998):

Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils.

J Immunol 160, 1402-1410

MANDEL, H. G. (2002):

Update on caffeine consumption, disposition and action.

Food Chem Toxicol 40, 1231-1234

MAREK, J. (1985):

On the non-specific antiinflammatory effects of other-than-antirheumatic drugs. Psychotropic drugs, inflammation and antiinflammatory drugs.

Int J Tissue React 7, 475-504

MARKS, V. u. J. F. KELLY (1973):

Absorption of caffeine from tea, coffee, and coca cola.

Lancet 1, 827

MARSHALL, J. M. (2000):

Adenosine and muscle vasodilatation in acute systemic hypoxia.

Acta Physiol Scand 168, 561-573

MCCOLL, S. R., M. ST-ONGE, A. A. DUSSAULT, C. LAFLAMME, L. BOUCHARD, J. BOULANGER u. M. POULIOT (2006):

Immunomodulatory impact of the A2A adenosine receptor on the profile of chemokines produced by neutrophils.

FASEB J 20, 187-189

MCEVER, R. P., K. L. MOORE u. R. D. CUMMINGS (1995):

Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions.

J Biol Chem 270, 11025-11028

MEINERS, I., S. HAUSCHILDT, K. NIEBER u. G. MUNCH (2004):

Pentoxifylline and propentophylline are inhibitors of TNF-alpha release in monocytes activated by advanced glycation endproducts.

J Neural Transm 111, 441-447

MERIGHI, S., P. MIRANDOLA, K. VARANI, S. GESSI, E. LEUNG, P. G. BARALDI, M. A. TABRIZI u. P. A. BOREA (2003):

A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy.

Pharmacol Ther 100, 31-48

MILLER, J. S., T. CERVENKA, J. LUND, I. J. OKAZAKI u. J. MOSS (1999):

Purine metabolites suppress proliferation of human NK cells through a lineage-specific purine receptor.

J Immunol 162, 7376-7382

MINERS, J. O., S. COULTER, R. H. TUKEY, M. E. VERONESE u. D. J. BIRKETT (1996):

Cytochromes P450, 1A2, and 2C9 are responsible for the human hepatic O-demethylation of R- and S-naproxen.

Biochem Pharmacol 51, 1003-1008

MINGUET, S., M. HUBER, L. ROSENKRANZ, W. W. SCHAMEL, M. RETH u. T. BRUMMER (2005):

Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors.

Eur J Immunol 35, 31-41

MONACO, C., E. ANDREAKOS, S. KIRIAKIDIS, M. FELDMANN u. E. PALEOLOG (2004):

T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases.

Curr Drug Targets Inflamm Allergy 3, 35-42

MONS, N. u. D. M. COOPER (1995):

Adenylate cyclases: critical foci in neuronal signaling.

Trends Neurosci 18, 536-542

MONTESINOS, M. C., P. GADANGI, M. LONGAKER, J. SUNG, J. LEVINE, D. NILSEN, J. REIBMAN, M. LI, C. K. JIANG, R. HIRSCHHORN, P. A. RECHT, E. OSTAD, R. I. LEVIN u. B. N. CRONSTEIN (1997):

Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A<sub>2</sub> (G alpha s-linked) receptors.

J Exp Med 186, 1615-1620

MORRISSEY, J. H. (2004):

Tissue factor: a key molecule in hemostatic and nonhemostatic systems.

Int J Hematol 79, 103-108

MOSER, G. H., J. SCHRADER u. A. DEUSSEN (1989):

Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood.

Am J Physiol 256, C799-806

MOSSER, D. M. (2003):

The many faces of macrophage activation.

J Leukoc Biol 73, 209-212

MOUE, M., M. TOHNO, T. SHIMAZU, T. KIDO, H. ASO, T. SAITO u. H. KITAZAWA (2008):

Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line.

Biochim Biophys Acta 1780, 134-144

MUELLER, S. N., C. M. JONES, C. M. SMITH, W. R. HEATH u. F. R. CARBONE (2002):  
Rapid cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus.

J Exp Med 195, 651-656

MULLER, W. A. u. G. J. RANDOLPH (1999):

Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes.

J Leukoc Biol 66, 698-704

MUNSHI, R., I. H. PANG, P. C. STERNWEIS u. J. LINDEN (1991):

A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go.

J Biol Chem 266, 22285-22289

NAESSENS, J. (1993):

Leukocyte antigens of cattle and sheep. Nomenclature.

Vet Immunol Immunopathol 39, 11-12

NARRAVULA, S., P. F. LENNON, B. U. MUELLER u. S. P. COLGAN (2000):

Regulation of endothelial CD73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endothelial barrier function.

J Immunol 165, 5262-5268

NGUYEN, D. K., M. C. MONTESINOS, A. J. WILLIAMS, M. KELLY u. B. N. CRONSTEIN (2003):

Th1 cytokines regulate adenosine receptors and their downstream signaling elements in human microvascular endothelial cells.

J Immunol 171, 3991-3998

NOWAK, M., L. LYNCH, S. YUE, A. OHTA, M. SITKOVSKY, S. P. BALK u. M. A. EXLEY The A2aR adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells.

Eur J Immunol 40, 682-687



O'BANION, M. K. (1999):

Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology.

Crit Rev Neurobiol 13, 45-82

OHTA, A. u. M. SITKOVSKY (2001):

Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage.

Nature 414, 916-920

OLAH, M. E., H. REN u. G. L. STILES (1995):

Adenosine receptors: protein and gene structure.

Arch Int Pharmacodyn Ther 329, 135-150

OLANREWAJU, H. A., W. QIN, I. FEOKTISTOV, J. L. SCEMAMA u. S. J. MUSTAFA (2000):

Adenosine A(2A) and A(2B) receptors in cultured human and porcine coronary artery endothelial cells.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 279, H650-656

ONDRACKOVA, P., H. KOVARU, F. KOVARU, L. LEVA u. M. FALDYNA (2013):

Adenosine modulates LPS-induced cytokine production in porcine monocytes.

Cytokine 61, 953-961

ONDRACKOVA, P., H. KOVARU, F. KOVARU, J. MATIASOVIC, L. LEVA u. M. FALDYNA (2012):

The effect of adenosine on pro-inflammatory cytokine production by porcine T cells.

Vet Immunol Immunopathol 145, 332-339

ORMEROD, M. G. u. P. R. IMRIE (1990):

Flow cytometry.

Methods Mol Biol 5, 543-558

OSTERUD, B. (1998):

Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles.  
*Blood Coagul Fibrinolysis* 9 Suppl 1, S9-14

PAGANO, R., E. NEGRI, A. DECARLI u. C. LA VECCHIA (1988):  
Coffee drinking and prevalence of bronchial asthma.  
*Chest* 94, 386-389

PANTHER, E., M. IDZKO, Y. HEROUY, H. RHEINEN, P. J. GEBICKE-HAERTER, U. MROWIETZ, S. DICHMANN u. J. NORGAUER (2001):  
Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells.  
*FASEB J* 15, 1963-1970

PAPAMICHAIL, M., S. A. PEREZ, A. D. GRITZAPIS u. C. N. BAXEVANIS (2004):  
Natural killer lymphocytes: biology, development, and function.  
*Cancer Immunol Immunother* 53, 176-186

PARKS, R. E., JR., D. D. DAWICKI, K. C. AGARWAL, S. F. CHEN u. J. D. STOECKLER (1985):  
Role of nucleoside transport in drug action. The adenosine deaminase inhibitor, deoxycoformycin, and the antiplatelet drugs, dipyridamole and dilazep.  
*Ann N Y Acad Sci* 451, 188-203

PEYOT, M. L., A. P. GADEAU, F. DANDRE, I. BELLOC, F. DUPUCH u. C. DESGRANGES (2000):  
Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A(2b)-purinoceptor.  
*Circ Res* 86, 76-85

PIERCE, K. D., T. J. FURLONG, L. A. SELBIE u. J. SHINE (1992):  
Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain.  
*Biochem Biophys Res Commun* 187, 86-93

PIKE, M. C., N. M. KREDICH u. R. SNYDERMAN (1978):

Requirement of S-adenosyl-L-methionine-mediated methylation for human monocyte chemotaxis.

Proc Natl Acad Sci U S A 75, 3928-3932

PILLINGER, M. H. u. S. B. ABRAMSON (1995):

The neutrophil in rheumatoid arthritis.

Rheum Dis Clin North Am 21, 691-714

POULIOT, M., M. E. FISET, M. MASSE, P. H. NACCACHE u. P. BERGEAT (2002):

Adenosine up-regulates cyclooxygenase-2 in human granulocytes: impact on the balance of eicosanoid generation.

J Immunol 169, 5279-5286

PRABHAKAR, U., D. P. BROOKS, D. LIPSHLITZ u. K. M. ESSER (1995):

Inhibition of LPS-induced TNF alpha production in human monocytes by adenosine (A2) receptor selective agonists.

Int J Immunopharmacol 17, 221-224

RAMANAVICIENE, A., J. ACAITE u. A. RAMANAVICIUS (2004):

Chronic caffeine intake affects lysozyme activity and immune cells in mice.

J Pharm Pharmacol 56, 671-676

RESTA, R., Y. YAMASHITA u. L. F. THOMPSON (1998):

Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73.

Immunol Rev 161, 95-109

RING, S., A. PUSHKAREVSKAYA, H. SCHILD, H. C. PROBST, V. JENDROSSEK, F. WIRSDORFER, C. LEDENT, S. C. ROBSON, A. H. ENK u. K. MAHNKE (2015):

Regulatory T Cell-Derived Adenosine Induces Dendritic Cell Migration through the Epac-Rap1 Pathway.

J Immunol 194, 3735-3744

RITTER, M., K. HOHENBERGER, P. ALTER, M. HERZUM, J. TEBBE u. M. MAISCH (2005):

Caffeine inhibits cytokine expression in lymphocytes.

Cytokine 30, 177-181

ROBBINS, C., KUMAR, COLLINS (1998):

Robbins Pathologic Basis of Disease.

W.B Saunders Company, Philadelphia

ROOS, D. u. K. M. DOLMAN (1990):

Neutrophil involvement in inflammatory tissue damage.

Neth J Med 36, 89-94

ROSENTHAL, L. A., D. D. TAUB, M. A. MOORS u. K. J. BLANK (1992):

Methylxanthine-induced inhibition of the antigen- and superantigen-specific activation of T and B lymphocytes.

Immunopharmacology 24, 203-217

ROZEMULLER, A. J., W. A. VAN GOOL u. P. EIKELENBOOM (2005):

The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications.

Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 4, 223-233

SAJJADI, F. G., K. TAKABAYASHI, A. C. FOSTER, R. C. DOMINGO u. G. S. FIRESTEIN (1996):

Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors.

J Immunol 156, 3435-3442

SALMON, J. A. u. G. A. HIGGS (1987):

Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators.

Br Med Bull 43, 285-296

SALMON, J. E., N. BROGLE, C. BROWNLIE, J. C. EDBERG, R. P. KIMBERLY, B. X. CHEN u. B. F. ERLANGER (1993):

Human mononuclear phagocytes express adenosine A1 receptors. A novel mechanism for differential regulation of Fc gamma receptor function.

J Immunol 151, 2775-2785

SALMON, J. E. u. B. N. CRONSTEIN (1990):

Fc gamma receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy. A1 receptors are stimulatory and A2 receptors are inhibitory.

J Immunol 145, 2235-2240

SAMET, M. K. (1985):

Inhibition of antibody production by 2-chloroadenosine.

Life Sci 37, 225-233

SAWYER, D. W., G. R. DONOWITZ u. G. L. MANDELL (1989):

Polymorphonuclear neutrophils: an effective antimicrobial force.

Rev Infect Dis 11 Suppl 7, S1532-1544

SAXENA, A. K., K. P. SINGH, S. N. SRIVASTAVA, S. KHANNA, L. J. SHUKLA u. R. SHANKER (1984):

Immunomodulating effects of caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in rodents.

Indian J Exp Biol 22, 298-301

SCHADDELEE, M. P., H. L. VOORWINDEN, E. W. VAN TILBURG, T. J. PATEMAN, A. P. IJZERMAN, M. DANHOF u. A. G. DE BOER (2003):

Functional role of adenosine receptor subtypes in the regulation of blood-brain barrier permeability: possible implications for the design of synthetic adenosine derivatives.

Eur J Pharm Sci 19, 13-22

SCHUBERTH, H. J., M. HADAM u. W. LEIBOLD (1991):

[Differentiation and transplantation antigens on the surface of mononuclear cells of cattle, horses and dogs].

Tierarztl Prax 19, 119-122

SCHWARTZ, J. u. S. T. WEISS (1992):

Caffeine intake and asthma symptoms.

Ann Epidemiol 2, 627-635

SCOTT, J. D. (1991):

Cyclic nucleotide-dependent protein kinases.

Pharmacol Ther 50, 123-145

SEEGMILLER, J. E., T. WATANABE u. M. H. SCHREIER (1977):

The effect of adenosine on lymphoid cell proliferation and antibody formation.

Ciba Found Symp 249-276

SEIDEL, M. G., M. KLINGER, M. FREISSMUTH u. C. HOLLER (1999):

Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway.

J Biol Chem 274, 25833-25841

SEMENZA, G. L. (2003):

Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders.

Annu Rev Med 54, 17-28

SEXL, V., G. MANCUSI, C. HOLLER, E. GLORIA-MAERCKER, W. SCHUTZ u. M. FREISSMUTH (1997):

Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells.

J Biol Chem 272, 5792-5799

SHIN, H. Y., C. S. LEE, H. J. CHAE, H. R. KIM, S. H. BAEK, N. H. AN u. M. H. KIM (2000):

Inhibitory effect of anaphylactic shock by caffeine in rats.

Int J Immunopharmacol 22, 411-418

SIPKA, A. (2008)

Charakterisierung der immunmodulatorischen Wirkung des Neuromediators Substanz P auf bovine Immunzellen.

Hannover, Arbeitsgruppe Immunologie,

SNYDER, F. F. u. J. F. HENDERSON (1973):

Alternative pathways of deoxyadenosine and adenosine metabolism.

J Biol Chem 248, 5899-5904

SODERLING, T. R. (1999):

The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade.

Trends Biochem Sci 24, 232-236

SOPP, P. u. C. J. HOWARD (2001):

IFN gamma and IL-4 production by CD4, CD8 and WC1 gamma delta TCR(+) T cells from cattle lymph nodes and blood.

Vet Immunol Immunopathol 81, 85-96

SOTTOFATTORI, E., M. ANZALDI u. L. OTTONELLO (2001):

HPLC determination of adenosine in human synovial fluid.

J Pharm Biomed Anal 24, 1143-1146

SPRINGER, T. A. (1995):

Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration.

Annu Rev Physiol 57, 827-872

STOUT, R. D. u. J. SUTTLES (2004):

Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments.

J Leukoc Biol 76, 509-513

STROHMEIER, G. R., W. I. LENCER, T. W. PATAPOFF, L. F. THOMPSON, S. L. CARLSON, S. J. MOE, D. K. CARNES, R. J. MRSNY u. J. L. MADARA (1997):

Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia.

J Clin Invest 99, 2588-2601

SUGIYAMA, K., Y. NODA u. P. HE (2001):

Suppressive effect of caffeine on hepatitis and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha, but not by the anti-Fas antibody, in mice.

Biosci Biotechnol Biochem 65, 674-677

SULLIVAN, G. W., H. T. CARPER u. G. L. MANDELL (1992):

Pentoxifylline modulates activation of human neutrophils by amphotericin B in vitro.

Antimicrob Agents Chemother 36, 408-416

SULLIVAN, G. W., L. S. LUONG, H. T. CARPER, R. C. BARNES u. G. L. MANDELL (1995):

Methylxanthines with adenosine alter TNF alpha-primed PMN activation.

Immunopharmacology 31, 19-29

SUNG, S. J. u. S. C. SILVERSTEIN (1985):

Inhibition of macrophage phagocytosis by methylation inhibitors. Lack of correlation of protein carboxymethylation and phospholipid methylation with phagocytosis.

J Biol Chem 260, 546-554

SVAHN, A., A. LINDE, R. THORSTENSSON, K. KARLEN, L. ANDERSSON u. H. GAINES (2003):

Development and evaluation of a flow-cytometric assay of specific cell-mediated immune response in activated whole blood for the detection of cell-mediated immunity against varicella-zoster virus.

J Immunol Methods 277, 17-25

SVENNINGSSON, P., G. G. NOMIKOS, E. ONGINI u. B. B. FREDHOLM (1997):

Antagonism of adenosine A2A receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens.

Neuroscience 79, 753-764

TAGA, T. u. T. KISHIMOTO (1992):

Role of a two-chain IL-6 receptor system in immune and hematopoietic cell regulation.

Crit Rev Immunol 11, 265-280

TAJIMA, M., K. HARUTA, S. KOBAYASHI, N. TAMURA u. H. HASHIMOTO (2001):

Pentoxifylline induces the shedding of L-selectin on polymorphonuclear cells by stimulation via adenosine receptor as well as by the inhibition of phosphodiesterase.



Mod Rheumatol 11, 65-71

TANAKA, H., K. NAKAZAWA, M. ARIMA u. S. IWASAKI (1984):

Caffeine and its dimethylxanthines and fetal cerebral development in rat.

Brain Dev 6, 355-361

TAYLOR, U., H. ZERBE, H. M. SEYFERT, D. RATH, U. BAULAIN, K. F. LANGNER u. H. J. SCHUBERTH (2009):

Porcine spermatozoa inhibit post-breeding cytokine induction in uterine epithelial cells in vivo.

Anim Reprod Sci 115, 279-289

THIELE, A., R. KRONSTEIN, A. WETZEL, A. GERTH, K. NIEBER u. S. HAUSCHILDT (2004):

Regulation of adenosine receptor subtypes during cultivation of human monocytes: role of receptors in preventing lipopolysaccharide-triggered respiratory burst.

Infect Immun 72, 1349-1357

THOMSON, L. F., J. M. RUEDI, A. GLASS, G. MOLDENHAUER, P. MOLLER, M. G. LOW, M. R. KLEMENS, M. MASSAIA u. A. H. LUCAS (1990):

Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73).

Tissue Antigens 35, 9-19

TOTH, B., M. ALEXANDER, T. DANIEL, I. H. CHAUDRY, W. J. HUBBARD u. M. G. SCHWACHA (2004):

The role of gammadelta T cells in the regulation of neutrophil-mediated tissue damage after thermal injury.

J Leukoc Biol 76, 545-552

TRAPANI, J. A. u. M. J. SMYTH (2002):

Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway.

Nat Rev Immunol 2, 735-747

TRINCHIERI, G. u. P. SCOTT (1995):

Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions.

Res Immunol 146, 423-431

TSUTSUI, S., J. SCHNERMANN, F. NOORBAKHSI, S. HENRY, V. W. YONG, B. W. WINSTON, K. WARREN u. C. POWER (2004):

A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis.

J Neurosci 24, 1521-1529

VAN FURTH, A. M., E. M. SEIJMONSBERGEN, J. A. LANGERMANS, P. H. VAN DER MEIDE u. R. VAN FURTH (1995):

Effect of xanthine derivatives and dexamethasone on Streptococcus pneumoniae-stimulated production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta (IL-1 beta), and IL-10 by human leukocytes.

Clin Diagn Lab Immunol 2, 689-692

VARANI, K., F. PORTALUPPI, S. GESSI, S. MERIGHI, F. VINCENZI, E. CATTABRIGA, A. DALPIAZ, F. BORTOLOTTI, L. BELARDINELLI u. P. A. BOREA (2005):

Caffeine intake induces an alteration in human neutrophil A2A adenosine receptors.

Cell Mol Life Sci 62, 2350-2358

VINEGAR, R., J. F. TRUAX, J. L. SELPH, R. M. WELCH, H. L. WHITE u. C. H. ELLIS (1976):

Potential of the anti-inflammatory and analgesic activity of aspirin by caffeine in the rat.

Proc Soc Exp Biol Med 151, 556-560

VON LUBITZ, D. K., W. YE, J. MCCLELLAN u. R. C. LIN (1999):

Stimulation of adenosine A3 receptors in cerebral ischemia. Neuronal death, recovery, or both?

Ann N Y Acad Sci 890, 93-106

WAKSMAN, Y., D. W. GOLDE, N. SAVION u. I. FABIAN (1990):

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances cationic antimicrobial protein synthesis by human neutrophils.

J Immunol 144, 3437-3443

WALKER, B. A., M. A. JACOBSON, D. A. KNIGHT, C. A. SALVATORE, T. WEIR, D. ZHOU u. T. R. BAI (1997):

Adenosine A3 receptor expression and function in eosinophils.

Am J Respir Cell Mol Biol 16, 531-537

WELLS, J. N., Y. J. WU, C. E. BAIRD u. J. G. HARDMAN (1975):

Phosphodiesterases from porcine coronary arteries: inhibition of separated forms by xanthines, papaverine, and cyclic nucleotides.

Mol Pharmacol 11, 775-783

WENDELBO, O. u. O. BRUSERUD (2003):

Functional evaluation of proliferative T cell responses in patients with severe T lymphopenia: characterization of optimal culture conditions and standardized activation signals for a simple whole blood assay.

J Hematother Stem Cell Res 12, 525-535

WILLIAMS, B. A., A. MANZER, J. BLAY u. D. W. HOSKIN (1997):

Adenosine acts through a novel extracellular receptor to inhibit granule exocytosis by natural killer cells.

Biochem Biophys Res Commun 231, 264-269

XAUS, J., A. F. VALLEDOR, M. CARDO, L. MARQUES, J. BELETA, J. M. PALACIOS u. A. CELADA (1999):

Adenosine inhibits macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation of macrophages through the induction of p27kip-1 expression.

J Immunol 163, 4140-4149

ZHOU, H., A. S. WOLBERG u. R. A. ROUBEY (2004):

Characterization of monocyte tissue factor activity induced by IgG antiphospholipid antibodies and inhibition by dilazep.

Blood 104, 2353-2358

ZIEGELSTEIN, R. C. (2004):

Wake up and smell the caffeine.

Am J Cardiol 94, 981-982

ZIMMERMANN, H. (2000):

Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 362, 299-309

## 9 Danksagung

An erster und wichtigster Stelle bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Apl. Prof. Dr. H.-J. Schubert für die umfangreiche, ausdauernde und kompetente Betreuung. Seinem unverbesserlichen Optimismus, seinem Verständnis und seiner Geduld ist es zu verdanken, dass diese Arbeit möglich wurde. Er stand mir jederzeit mit einem offenen Ohr und viel Hilfestellung zur Seite. Dabei waren seine humorvolle Art und seine Ideen stets Quell bester Inspirationen. Nicht nur fachlich, sondern auch persönlich war er mir ein Mentor und Betreuer und brachte mich durch einige schwierige Situationen. Vielen lieben Dank.

Der Firma Dr. Schaette AG danke ich für die finanziellen Mittel und die vielen Hilfestellungen. Sie stand mir jederzeit auch bei kritischen Fragen stets zur Seite. Insbesondere Herrn Dr. Schaette persönlich danke ich für die konstruktiven Gespräche und die Geduld.

Mein herzlichster Dank geht an die Mitarbeiter des Labors der Arbeitsgruppe Immunologie: Frau Silke Schöneberg, Frau Sonja Kordex und Herrn Udo Rabe. Mit einer Engelsgeduld standen sie mir stets im professionellen wie auch im persönlichen Umgang zur Seite. Dass sie alle Fragen auch zum wiederholten Male freundlich und aufgeschlossen beantworteten, ist nicht selbstverständlich. Sie machten das Labor und die AG Immunologie zu einem Ort, an dem man gerne gearbeitet hat. Ein ganz persönliches herzliches Dankeschön geht an Dr. Mirja Koy, die unerschütterlich und mit viel positiver Energie mich stets aufs Neue motivierte und mir mit vielen Dingen weiterhelfen konnte.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Klinik für kleine Klautiere, die mir unermüdlich und mit viel Einfühlungsvermögen bei so manchen Startschwierigkeiten geholfen hat. Ebenso das Lehr- und Forschungsgut Ruthe verdient Dank und Anerkennung, insbesondere Dr. Christian Sürle.

Ich bedanke mich herzlich bei allen meinen ehemaligen Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe Immunologie. Durch euch wurde die Immunologie eine Art zweite Heimat. Ich habe dort viele Freunde gefunden und die Hilfsbereitschaft und der Zusammenhalt auch nach einigen Jahren machte die Zeit in der Immunologie unvergesslich. Gemeinsam haben wir gekocht, gelacht, gefeiert und gelitten. Es war eine tolle Zeit. Vielen Dank an meine treue Zimmergenossin Anna Düvel.

Ein ganz großes Dankeschön muss auch der Klinik für Kleintiere ausgesprochen werden. Hier insbesondere Herrn Prof. Dr. Fehr und Frau Dr. Prüfer, welche mir in der letzten Phase der

## Danksagung

---

Arbeit die Möglichkeit gegeben haben, die nötige Zeit und Ruhe zu investieren. Allen Arbeitskollegen, insbesondere Dir, Betty, spreche ich hiermit meinen herzlichsten Dank aus, da sie zeitweise auch meine Aufgaben übernommen haben um mich zu entlasten. Danke!!!

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter Ingrid Dziallas, die mir durch ihre bedingungslose Unterstützung und Hilfe erst die Erreichung dieses Lebensabschnittes ermöglichte. Diese Arbeit widme ich Ihr.

Und zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Jasmin Kretschmer für unendlich viel Geduld, die Aufmunterung und den Trost in manch schwerer Zeit. Ohne deine Kochkünste wäre ich verhungert. Ich weiß nicht, wie viele Gummibärchentüten du herangeschafft hast... Vielen Dank für das tapfere Korrekturlesen, ich hoffe, auch du bist nun ein Fan von Schachtelsätzen. Du warst für mich da, das vergesse ich Dir nie... ich liebe Dich mein Goldstück !