

Aus der Klinik für Hals,- Nasen- und Ohrenheilkunde

Direktion: Frau Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg

**Stickstoffmonoxid-Metabolismus in chronischer Rhinosinusitis  
mit Polypen unter Einflussnahme von 1,8-Cineol**

**Inauguraldissertation**

**zur**

**Erlangung der Doktorwürde**

**der**

**Universität zu Lübeck**

**-Aus der Sektion Humanmedizin-**



**vorgelegt von**

**Frederick Benecke**

**aus Hollenstedt**

**Lübeck, im September 2018**

1. Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Norbert Brüggemann

Tag der mündlichen Prüfung:

19.02.2020

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den

19.02.2020

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

# **1 Inhaltsverzeichnis**

1	Inhaltsverzeichnis .....	1
2	Einleitung .....	4
2.1	Rhinosinusitis .....	4
2.1.1	Chronische Rhinosinusitis.....	4
2.1.2	Therapie der chronischen Rhinosinusitis mit nasalen Polypen.....	8
2.2	Cineol.....	10
2.3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)</i> .....	11
2.4	Stickstoffmonoxid und Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) .....	14
2.4.1	Endotheliale NO-Synthase.....	14
2.4.2	Induzierbare NO-Synthase .....	16
2.5	Stickstoffmonoxid als Signaltransmitter .....	17
2.5.1	Der cGMP-abhängige Weg .....	17
2.5.2	Der cGMP-unabhängige Weg.....	17
2.6	Apoptose und Caspasen .....	19
3	Fragestellung der Arbeit.....	20
4	Material und Methoden .....	21
4.1	Puffer und Lösungen .....	21
4.2	Reagenzien .....	21
4.3	Kits.....	24
4.4	Antikörper .....	24
4.5	Gewebe .....	25
4.6	Geräte.....	26
4.7	Weitere Materialien .....	27
4.8	Software .....	28
4.9	Isolation des Gewebes aus dem Patienten .....	29
4.10	Molekularbiologische Methoden .....	29
4.10.1	Microarray-Analyse .....	29
4.10.2	RNS- Isolation aus humanem Gewebe .....	29
4.10.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	30
4.10.4	cDNS- Synthese .....	30
4.10.5	Quantitative real-time PCR .....	31
4.11	Biochemische Methoden .....	33

4.11.1	Western Blotting .....	33
4.11.2	Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	35
4.11.3	Kalorimetrische NO-Messung .....	37
4.11.4	Phosphokinase-Protein-Array .....	39
4.11.5	Histologie.....	40
4.12	Statistik.....	41
5	Ergebnisse .....	42
5.1	Expression von eNOS, Nostrin und Caspase8 in CRSwNP .....	42
5.1.1	Microarray.....	43
5.1.1	Western-Blot-Analyse .....	44
5.1.2	Phosphokinasearray-Analyse .....	45
5.1.3	Immunfluoreszenz-Analyse.....	46
5.2	Expression von eNOS, STAT3, Nostrin und Caspase-8 unter Inkubation mit Cineol.....	47
5.2.1	eNOS-Signaling- Array .....	47
5.2.2	Phosphokinasearray-Analyse .....	48
5.2.3	Western-Blot-Analyse von eNOS.....	49
5.2.4	Western-Blot-Analyse von STAT3.....	51
5.2.5	Western-Blot-Analyse von Caspase-8 und Nostrin .....	54
5.3	iNOS-Expression und NO-Produktion unter Inkubation mit Cineol .....	55
6	Diskussion.....	57
6.1	Erhöhte eNOS-Aktivierung in CRSwNP.....	57
6.2	Erhöhte STAT3-Aktivierung in CRSwNP.....	59
6.3	Die Rolle von Cineol auf die Phosphorylierung von eNOS und STAT3 .....	60
6.4	Der Zusammenhang zwischen STAT3-Aktivität und eNOS-Expression .....	63
6.5	Die Wirkung von Cineol auf Nostrin und Caspase 8.....	65
6.6	Die Wirkung von Cineol auf die iNOS und die NO-Produktion.....	66
6.7	Ausblick .....	68
7	Zusammenfassung.....	70
8	Literaturverzeichnis.....	71
9	Formel- und Tabellenverzeichnis .....	80
9.1	Formelverzeichnis .....	80
9.2	Tabellenverzeichnis.....	80
10	Abbildungsverzeichnis.....	81
11	Abzürungsverzeichnis.....	83

12	Danksagungen .....	86
13	Genehmigung der Ethikkommission.....	87
14	Lebenslauf .....	88

## **2 Einleitung**

### **2.1 Rhinosinusitis**

Die Definition einer Rhinosinusitis stützt sich sowohl auf klinische als auch auf bildgebende und endoskopische Parameter. Die klinischen Zeichen einer entzündlichen Veränderung der Nasenhaupthöhlen und der Nasennebenhöhlen sind nasale Obstruktion und eine anteriore oder posteriore Rhinorrhoe. Beide Symptome müssen für die Diagnose einer Rhinosinusitis vorhanden sein. Fakultativ können eine Hyposmie oder Anosmie auftreten, sowie Schmerzen oder ein Druckgefühl im Gesicht. Neben diesen klinischen Kriterien muss ein endoskopisches oder Computertomographie (CT)-morphologisches Merkmal erfüllt sein. Endoskopische Zeichen einer Rhinosinusitis sind nasale Polypen, purulenter Ausfluss im Bereich des mittleren Nasengangs oder eine hier befindliche Obstruktion durch ödematös veränderte Schleimhaut. Computertomographisch lassen Veränderungen- seien sie angeboren oder erworben- im ostiomeatalen Komplex und mukosale Veränderungen der Nasennebenhöhlen an eine Rhinosinusitis denken. Diese fallen in der CT durch eine Volumenminderung oder eine Verdickung der wandbildenden Strukturen auf [24].

#### **2.1.1 Chronische Rhinosinusitis**

Von einer chronischen Rhinosinusitis spricht man bei einer Persistenz der Symptome über 12 Wochen. Die chronische Rhinosinusitis wird in eine Form ohne (CRSsNP) und eine Form mit nasaler Polyposis (CRSwNP) eingeteilt. Folgend wird genauer auf die CRSwNP eingegangen.

##### **2.1.1.1 Epidemiologie**

Es gibt in der Literatur keine Studie bezüglich der Epidemiologie der CRSwNP in der deutschen Bevölkerung, sodass die Häufigkeit nur mithilfe anderer Studien aus westlichen Ländern abgeschätzt werden kann. Epidemiologische Daten zu nasaler Polyposis (CRSwNP) lassen sich nur mit Hilfe von Querschnittstudien abschätzen. So kommen Johansson *et al.* in einer schwedischen Studie auf eine Prävalenz von 2,7 %, wobei die nasalen Polypen endoskopisch diagnostiziert wurden. Männliche Probanden (2,2:1), ältere Menschen ab 60 Jahre (5 %) und Probanden mit einem vordiagnostiziertem Asthma bronchiale litten häufiger an CRSwNP [48]. Eine auf einem krankheitsspezifischen Fragebogen basierende Studie aus Frankreich ermittelte eine Prävalenz von 2,1 %, wobei es zu keiner geschlechtsspezifischen Häufung kam [57]. Nasale Polypen treten in allen Ethnien auf und die Prävalenz steigt mit dem Alter [57, 59].

### **2.1.1.2 Komorbiditäten**

Die CRSwNP ist häufig mit einer Acetylsalicylsäure (ASS)-Unverträglichkeit und Asthma bronchiale [45] assoziiert. Treten die drei Entitäten gemeinsam auf spricht man von der Samter-Trias [86] oder dem Morbus Widal [115]. 26% der Patienten mit CRSwNP sind an Asthma bronchiale erkrankt, wohingegen nur 7% der Patienten mit einem Asthma bronchiale an nasaler Polyposis leiden [57, 69]. Patienten mit Asthma bronchiale und CRSwNP haben in Folge dessen vermehrt nasale Symptome, darunter Hyposmie. Interessanterweise konnten Alobid *et al.* zeigen, dass die Schwere der Hyposmie prospektiv gut mit der Schwere der Polyposis nasi und einem persistierenden Asthma korreliert. Patienten mit nasalen Polypen und einer schweren Hyposmie haben daher ein erhöhtes Risiko ein persistierendes Asthma zu entwickeln [1]. Bei Patienten mit einer ASS-Intoleranz treten häufig nasale Polypen auf. Die letzten Erhebungen stammen aus den siebziger und achtziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts und die Angaben schwanken zwischen 35% [91] und bis zu 71% [99]. Nasale Polypen können auch im Rahmen anderer Erkrankungen auftreten. Allen voran ist hier die Zystische Fibrose zu nennen. In einer Studie mit 211 Probanden, die an Zystischer Fibrose erkrankt sind, konnten Hadfield *et al.* endoskopisch nasale Polypen in 37 % der Fälle nachweisen [36]. Seltene Differentialdiagnosen bei nasalen Polypen stellen die eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (Churg-Strauss) [115], die allergische Pilzsinusitis [41], das Kartagener-Syndrom [84] und das Young-Syndrom dar [94].

### **2.1.1.3 Immunologische Aspekte**

Die zwei Formen der chronischen Rhinosinusitis, CRSsNP und CRSwNP, sind als zwei Krankheitsentitäten anzusehen. Dies wird besonders deutlich, wenn die zugrundeliegenden Entzündungsmechanismen näher beleuchtet werden. In einem Großteil der Polypen von Menschen kaukasischer Ethnie liegt der Entzündung eine Antwort vom T-Helfertyp (Th)2-Typ mit Eosinophilie zugrunde, wohingegen bei chronischer Rhinosinusitis ohne Polyposis eine Th1-Antwort mit Neutrophilie dominiert. Es ist jedoch darüber hinaus erwiesen, dass nasale Polypen bei Menschen asiatischer Ethnie eine Th1-Polarisation aufweisen [2].

T-Helferzellen sind eine Untergruppe der T-Lymphozyten. Sie dienen nach der Erkennung des jeweiligen Antigens als Aktivator von Effektorzellen, wobei wenigstens zwei Arten unterschieden werden. Es gibt einerseits Th1-Zellen, die bei einer Infektion durch intrazelluläre Erreger eine wichtige Rolle spielen und Effektorzellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten via Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und

Interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) rekrutieren und zur zellvermittelten Immunreaktion führen. Andererseits fördern Th2-Zellen eine humorale Immunantwort, wobei B-Lymphozyten zu Plasmazellen differenzieren, Antikörper gegen extrazelluläre Erreger bilden und eosinophile Granulozyten rekrutiert werden. In diesen Fall stehen IL-4, IL-5 und IL-13 im Mittelpunkt. Es findet eine Kreuzhemmung statt, was eine Polarisierung zu einem inflammatorischen Profil nach sich zieht. Der Grund für die Polarisierung der Immunantwort zur Th2-Antwort in CRSwNP ist nicht bekannt. Es wird angenommen, dass die Epithelzellen des oberen Respirationstrakts eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen und durch die Überproduktion von IL-25, IL-33 und *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) die pathologische Polarisierung fördern [8].

#### **2.1.1.4 Makroskopie und Histopathologie nasaler Polypen**

Nasale Polypen imponieren nach Exstirpation als grau-gelbliche traubenförmige Strukturen glänzender Oberfläche. Ihre Größe variiert stark und liegt zwischen wenigen Millimetern bis zu einigen Zentimetern bei schweren Befunden.

Histologisch lassen sich nasale Polypen in vier Typen einteilen. Mit rund 70% ist der ödematöse oder eosinophile Polyp die häufigste Form. Er ist gekennzeichnet durch Becherzellhyperplasie im respiratorischen Epithel, welches auf einer verdickten Basalmembran situiert ist. Das Stroma ist ödematös verändert und enthält eine erhöhte Anzahl von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. Der fibroinflammatorische Polyp zeigt ein Fehlen des Ödems im Stroma, das vornehmlich mit Lymphozyten infiltriert ist. Neben dem stromalen Ödem fehlt auch die Becherzellhyperplasie. Polypen mit seromuzinöser Drüsenhyperplasie zeigen ebendiese Strukturen im Stroma und ähneln sonst morphologisch stark dem eosinophilen Polypen. Sehr selten in ungefähr 3% der Fälle finden sich atypische Stromazellen. Die Atypie macht eine Abgrenzung zu einem malignen Geschehen oft schwierig, gerade da diese Entität wenig bekannt ist [15].

<b>Polypenentität</b>	<b>Häufigkeit</b>
eosinophiler Polyp	73%
fibroinflammatorischer Polyp	18%
Polyp mit Drüsenhyperplasie	6,7%
Polyp mit atypischen Stromazellen	2,3%

**Tabelle 1: Häufigkeit von verschiedenen Polypenentitäten nach Couto et al. [18]**

### **2.1.1.5 Ätiologie und Pathogenese**

#### **2.1.1.5.1 Immunbarriere- und Staphylococcus-aureus-Hypothese**

Einen Versuch, die chronische Entzündung und somit die Ätiologie der CRSwNP zu erklären, unternimmt die Immunbarrierehypothese [54]. Diese beschreibt, dass durch Mikrotraumata der nasalen Mukosa, wie sie auch bei gesunden Menschen vorkommen, das lokale angeborene Immunsystem mit Antigenen konfrontiert wird und auf diese im Krankheitsfall inadäquat reagiert. Bei einem Großteil der Patienten mit CRSwNP liegt eine Kolonialisierung der Nasenmukosa mit *Staphylococcus aureus*, einem gram-positiven Bakterium, vor [122]. Dieser Keim ist in der Lage, superantigene Toxine zu sezernieren, was zu einer unkontrollierten, lokalen T-Zellaktivierung führt. Dieser Umstand wird als *Staphyococcal Superantigen Hypothesis* bezeichnet. Es ist erwiesen, dass diese T-Zellaktivierung in nasalen Polypen von den meisten Menschen kaukasischer Ethnie vom Th2-Typ ist, was eine Erhöhung von IL-4, und -5 und demgegenüber eine Erniedrigung von TGF- $\beta$ 1 bedeutet [76]. Tripathi *et al.* konnten nachweisen, dass 78 % der Patienten, die an CRSwNP litten, Immunglobuline vom Typ E gegen Toxine mit superantigenen Charakter von *Staphylococcus aureus* gebildet hatten. Keine Kontrollperson ohne CRSwNP bildete solche Immunglobuline [107]. Ein erhöhter IgE-Titer gegen *Staphylococcus-aureus*-Toxine korreliert des Weiteren positiv mit der Wahrscheinlichkeit ein Asthma bronchiale zu entwickeln. Neben den Superantigenen von *Staphylococcus aureus* leistet auch die Biofilmbildung dieses Bakteriums ihren Beitrag zur Pathogenese der CRSwNP. In Biofilmen können pathologische Bakterien sowohl der Immunantwort des Wirts, als auch antimikrobiellen Substanzen wie Antibiotika entgehen. Biofilme können neben Superantigenen selbst auch eine pathologische Th2-Antwort in CRSwNP hervorrufen [25]. Jedoch spielen Biofilme nicht nur pathogenetisch eine Rolle, sondern bestimmen auch entscheidend die Schwere der Entzündung und den Therapieerfolg nach Operationen. So haben Patienten mit *Staphylococcus-aureus*-Biofilmen ein schlechteres postoperatives Ergebnis, was eine Persistenz der Symptome bei rund 42 % bedeutete, während 50 % der Patienten bei postoperativer Endoskopie weitere Zeichen einer Sinusitis wie ödematöse Schleimhaut oder Pus im mittleren Nasengang zeigten [80].

#### **2.1.1.5.2 Pilzhypothese**

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass lange Zeit Pilze der Gattung *Alternaria* als CRSwNP-verursachendes Pathogen vermutet wurden, deren Zellbestandteile in der Lage waren, eine gemischte Th1/2-Antwort bei Epithelzellen *in vitro* auszulösen [97]. Diese

Ergebnisse konnten jedoch von anderen Gruppen nicht verifiziert werden, sodass der Pilz-Hypothese heute eine untergeordnete Rolle bei der Pathogenese eingeräumt wird.

#### 2.1.1.5.3 Eikosanoid-Stoffwechsel

Die klinisch relevanten Eikanoide sind Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene; alle drei Gruppen werden aus der Arachidonsäure synthetisiert, einer vierfach ungesättigten Fettsäure.

Die proinflammatorischen Leukotriene sind in Polypen mit eosinophiler Infiltration signifikant erhöht. Gleiches gilt für das herstellende Enzym, die Leukotrien-C4-Synthase [100]. Ebenfalls proinflammatorische Eigenschaften besitzt das Prostaglandin D. Es wirkt chemotaktisch auf Eosinophile, Basophile und Mastzellen. Prostaglandin D lässt sich in CRSwNP vermehrt nachweisen [34, 74, 78]. Das antiinflammatorische Prostaglandin E ist demgegenüber vermindert exprimiert. Interessanterweise konnten Studien nachweisen, dass Superantigene von *Staphylococcus aureus* einen inhibierenden Einfluss auf die PGD-E2-Synthese haben, sodass sich diese beiden Theorien zur Ätiopathogenese der CRSwNP nicht ausschließen, sondern vielmehr ergänzen [75, 81].

### 2.1.2 Therapie der chronischen Rhinosinusitis mit nasalen Polypen

#### 2.1.2.1 Kortikosteroide

Die Therapie der chronischen Rhinosinusitis mit Polyposis fußt auf topischer und systemischer Applikation von Kortikosteroiden, sowie der endoskopischen Chirurgie. In einer Metaanalyse von Fokkens *et al.* mit 38 Studien konnte gezeigt werden, dass die topische Applikation von Glukokortikoiden signifikant die Größe der Polypen, Rezidive der Polypen und die nasale Obstruktion senkt [24]. Auch die systemische Therapie mit Glukokortikoiden ist bei unzureichendem Erfolg der topischen Anwendung bei CRSwNP etabliert, da sie effektiv die Symptome, wie nasale Obstruktion und Hyposmie, sowie die Größen der Polypen verbessert [39, 55]. Es ist in diesem Falle immer auf systemische Nebenwirkungen einer Steroid-Therapie zu achten ist. So konnten Vaidyanathan *et al.* in ihrer Studie zeigen, dass die Osteoblastenaktivität und der Cortisolspiegel im Morgenurin nach zwei Wochen Therapie mit 25 mg Prednisolon pro Tag sinken. Dies sind erste Anzeichen für systemische Nebenwirkungen; acht Wochen nach Absetzen waren diese Effekte jedoch nicht mehr nachweisbar [109]. Es ist zu betonen, dass die systemische Steroidtherapie immer eine Kurzzeittherapie ist und bei Persistenz oder Nichtansprechen, die Chirurgie das Mittel der Wahl ist, wobei Wright *et al.* auch für diesen Fall nachweisen konnten, dass eine perioperative Steroidtherapie sich positiv auf die mukosale Heilung

auswirkt [118]. Eine Therapie mit Leukotrienantagonisten wie Montelukast scheint aus pathogenetischen Überlegungen sinnvoll. So kann Montelukast additiv zur Standardtherapie mit Steroiden Symptome wie Cephalgien und Gesichtsschmerz signifikant senken [101]. Postoperativ ist Montelukast der Standardmedikation mit nasalen Steroiden nicht überlegen. In beiden Fällen kommt es zu einer signifikanten Senkung der Symptome [70].

### **2.1.2.2 Antibiotika**

Die Therapie mit Antibiotika ist bei der chronischen Rhinosinusitis mit Polypen nicht etabliert. Es gibt jedoch interessante Ansätze, die antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften von Makrolidantibiotika und Doxycyclin auszunutzen. So konnte Doxycyclin die Polypengröße während einer 20-tägigen Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe in ähnlicher Weise senken wie Methylprednisolon [110]. Zu Makroliden gibt es Studien unterschiedlicher Aussage. So senkte Roxithromycin Symptome und Polypenlast während einer zwölfwöchigen Therapie signifikant [113], Azithromycin war dazu nicht in der Lage [112]. Allerdings ist zu betonen, dass Makrolid-Antibiotika bei Patienten mit nicht erhöhten IgE-Spiegeln besser wirken, als bei solchen mit erhöhten [113], was die Notwendigkeit einer individualisierten Therapie der CRSwNP unterstreicht.

### **2.1.2.3 Chirurgie**

Versagt die konventionelle antientzündliche Therapie, ist eine chirurgische Therapie im Sinne einer *FESS (functional endoscopic sinus surgery)* indiziert. Die Methode ist sehr effektiv und sicher, wie eine Studie aus dem Vereinigten Königreich aufzeigt [40] und verbessert die Lebensqualität der Patienten entscheidend [98]; die Hauptsymptome behinderte Nasenatmung und Gesichtsschmerz bessern sich häufig, Cephalgien und Hyposmie zeigen schlechtere Ergebnisse [12]. Revisionsoperationen mussten in 11,4% der Fälle durchgeführt werden [40]; auf den Vorteil einer perioperativen antientzündlichen Therapie wurde bereits hingewiesen. Positive Prädiktoren für eine erhöhte Rezidivrate sind ASS-Intoleranz, Asthma bronchiale, besonders große Polypen, vorangegangene Revisionschirurgie und zystische Fibrose [40].

## 2.2 Cineol

1,8-Cineol, auch Eukalyptol genannt, ist chemisch betrachtet ein Monoterpenoid, das in einigen Pflanzen als essentielles Öl vorkommt. So enthalten der Eukalyptusbaum, Salbei, Rosmarin und die Pflanzengattung der Guaven größere Mengen 1,8-Cineol in ihren Blättern [4, 87, 121]. Schon lange Zeit wird Cineol als antientzündliches und mukolytisches Agens bei Infektionen des Respirationstrakts, wie Bronchitis und Rhinosinusitis, als Hausmittel eingesetzt; darüber hinaus werden ihm analgetische Eigenschaften zugeschrieben [88].

In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Cineol einen inhibitorischen Effekt auf die Bildung von künstlich induzierten Krallengranulomen bei Ratten hat. Ebenso senkt es die artifiziell erhöhte peritoneale Kapillarpermeabilität bei Mäusen [89]. Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) ist ein Stoff der häufig genutzt wird, um bei Ratten eine Colitis auszulösen. In einer tierexperimentellen Studie wurden Ratten 24 Stunden und zwei Stunden vor Colitisinduktion mit Cineol behandelt, was die kolorektale Entzündung signifikant abschwächte [89]. Es konnten zudem für Eukalyptusöl, dessen wichtiger Bestandteil 1,8-Cineol ist, antibakterielle Eigenschaften beschrieben werden. Eukalyptusöl hemmte das Wachstum von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*, nicht aber von gram-negativ multiresistenten Erregern [72].

Juergens *et al.* konnten in einer doppelblind-randomisierten klinischen Studie nachweisen, dass 1,8-Cineol einen Glukokortikosteroid-sparenden Effekt bei Patienten mit schwerem Asthma hat. Bei 12 von 16 Patienten konnte ein Prednisolon-reduzierender Effekt nachgewiesen werden. Dreimal pro Tag wurden 200 mg Cineol additiv zur Standardmedikation eingenommen. In der Placebogruppe gelang der Steroid-einsparenden Effekt nur bei vier von sechszehn Probanden [50]. Eine ebenfalls positive Wirkung von Cineol konnte bei Probanden mit der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung festgestellt werden. 242 Probanden im Stadium 2 und 3 nach *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)* wurden in der Winterzeit für sechs Monate mit entweder 200 mg Cineol dreimal täglich oder mit Placebo behandelt. Es konnte ein signifikanter Effekt auf die Menge, Schwere und Dauer der Exazerbationen nachgewiesen werden. Lungenfunktion, Dyspnoe und Lebensqualität waren als Ausdruck der besser kontrollierten Erkrankung ebenfalls signifikant positiv beeinflusst [117]. In einer 152 Probanden starken doppelblind-randomisierten Studie über nicht-purulente CRSsNP konnte eine dreimalige

Gabe pro Tag von 100 mg Cineol für eine Woche Symptome wie Gesichtsschmerz, nasale Obstruktion und Rhinorrhoe entscheidend lindern [53].

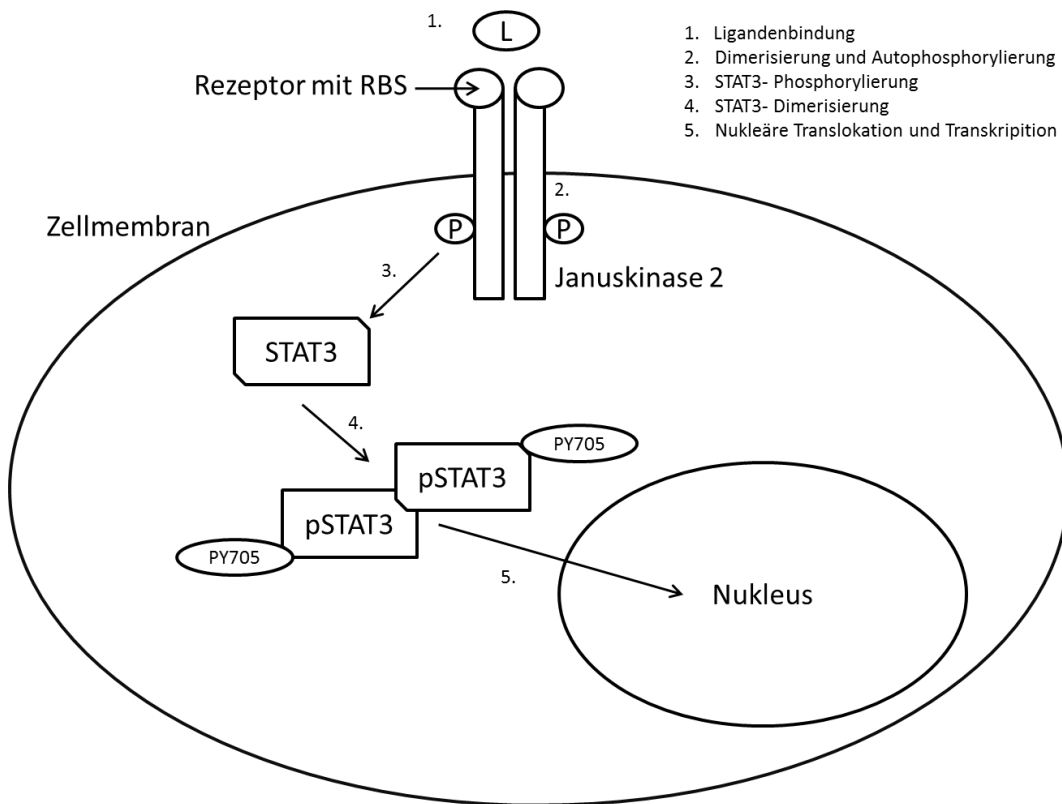
Es gilt also klinisch und tierexperimentell als erwiesen, dass das Phytotherapeutikum Cineol antiinflammatorische Eigenschaften besitzt. Wenig ist allerdings über seinen Wirkungsmechanismus auf molekularer und zellulärer Ebene bekannt. Es ist erwiesen, dass Cineol einen inhibierenden Einfluss auf den Cyclooxygenase (COX)-Stoffwechsel und die Produktion von Zytokinen in Monozyten hat. *In vitro* nimmt die Produktion von TNF- $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , Leukotrien B4 und Thromboxan B2 signifikant ab [51]. Es wird vermutet, dass dies über einen *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* -(NF- $\kappa$ B) abhängigen Mechanismus passiert. NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der unabdingbar für eine Entzündungsantwort beim Menschen ist. Cineol kann die nukleären Translokation von NF- $\kappa$ B in humanen malignen Zelllinien konzentrations- und zeitabhängig inhibieren und so dessen transkriptionelle Aktivität einschränken. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha* (I $\kappa$ B) als direkter NF $\kappa$ B-Inhibitor zeigte erhöhte Werte auf Proteinlevel nach Cineolstimulation [35]. Die mukolytische Wirkung von Cineol beruht ebenfalls auf einem NF- $\kappa$ B-abhängigem Mechanismus, was in einer *ex-vivo*-Studie nachgewiesen werden konnte. Dazu wurde nasale Mukosa kultiviert, um anschließend mit Lipopolysacchariden (LPS) eine bakterielle Infektion zu imitieren, was als physiologische Antwort zu einer Erhöhung der Becherzellzahl führte. Wurde simultan mit LPS und Cineol beimpft, blieb ebendiese Erhöhung aus. Mit einer Polymerase-Kettenreaktion (eng. *polymerase chain reaction* [PCR]) konnte darauffolgend nachgewiesen werden, dass es zu einer Erniedrigung der Mucin-Gene MUC2 und MUC9 kam. Parallel wurde immunzytochemisch eine gedämpfte NF- $\kappa$ B-Aktivität beschrieben [104].

Zusammenfassend gibt es einige interessante Hinweise darauf, dass Cineol bei chronischen Infektionen des Menschen antientzündliche Wirkung entfalten kann. Zu wenig ist allerdings über die genauen Mechanismen und über Cineol im Kontext von CRSwNP bekannt.

### **2.3 Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)**

Die Familie der *Signal Transducer in Activator of Transcription* (STAT) ist eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren und bestehen aus sieben Mitgliedern (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b,

6). Sie sind Teil des Janus- Kinasen (JAK)/STAT-Signalwegs und damit an zellulären Prozessen wie Proliferation, Wachstum und Immunreaktionen beteiligt.



**Abbildung 1: Schematischer Ablauf von der Ligandenbindung an einer Tyrosinkinase bis zur STAT-Translokation, RBS:Rezeptorbindungsstelle**

Die Signalkaskade beginnt mit einer Ligandenbindung an der Ligandenbindungsstelle (LBS) der Tyrosinkinase. Im Falle von STAT3 sind dies unter anderen IL-6 oder der *epidermal growth factor* (EGF). Durch die Bindung wird die Tyrosinkinase aktiviert und dimerisiert, was zu einer Autophosphorylierung des Dimers führt. In diesem Zustand ist es dem Protein möglich seine Tyrosinkinase-Aktivität zu entfalten. Es erfolgt eine Phosphorylierung und Aktivierung von STATs. Die STATs dimerisieren ebenso und haben nun eine erhöht Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Bindungsaffinität. Durch Translokation in den Zellkern ist es ihnen möglich, ihrer transkriptionellen Aufgabe nachzukommen [82].

Störungen in diesem Signalweg haben klinisch eine wichtige Bedeutung. So haben 100% aller Patienten mit Polycythaemia vera eine aktivierende Mutation im Gen der JAK-2. Alle anderen myeloproliferativen Erkrankungen bis auf die chronisch myeloischen Leukämie sind ebenfalls mit einer Mutation in dem JAK-2 Gen assoziiert [28]. Mutationen im STAT3-Gen mit konsekutiver Dysfunktion des Proteins lösen das Hyper-IgE-Syndrom aus (alt: Hiob-Syndrom), eine systemische Erkrankung mit ekzematoiden Dermatitiden und

pulmonalen Infektionen ab dem Säuglingsalter [27]. Das extrem seltene Laron-Syndrom Typ 2 ist eine Form des Kleinwuchses, welche mit einem mutierten STAT5B-Gen assoziiert ist [125].

Besonders hervorzuheben ist die Bedeutung von STAT3 bei proliferativen Erkrankungen, insbesondere malignen Neoplasien, da eine konstitutiv erhöhte STAT3-Aktivität hier zu einer Blockierung der Apoptose, Angiogenese sowie Filialisierung und somit Tumorprogression führt. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors wird durch eine Phosphorylierung am Tyrosinrest 705 erreicht [49]. Bei nahezu allen häufigen malignen Neoplasien des Menschen, darunter auch dem Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs (eng. *head and neck squamous cell carcinoma* [HNSCC]) ist eine erhöhte STAT3- Aktivität nachzuweisen [33, 49]. Klinisch wird durch Therapeutika, welche das Ziel haben, den pathologisch aktivierten JAK/STAT-Signalweg zu hemmen, versucht eine Erniedrigung der STAT3-Aktivität zu erreichen. Prominente Vertreter sind Erlotinib als Inhibitor des EGF-Rezeptors mit Tyrosinkinaseaktivität bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom oder Cetuximab als monoklonaler Antikörper gegen ebenjenen Rezeptor bei HNSCC und dem Adenokarzinom des Kolons. Die Gabe dieser Mittel führt zu einer signifikanten Lebensverlängerung und sollte nicht als kuratives Therapeutikum verkannt werden [60, 108].

In CRSwNP gibt es widersprüchliche Berichte über die STAT3-Expression. Linke *et al.* und Zhang *et al.* beschreiben eine erhöhte Phosphorylierung von STAT3 an seinem Tyrosinrest 705, was mit einer erhöhten Aktivität gleichzusetzen ist. Linke *et al.* betonen darüber hinaus eine nukleäre Translokation, was gut mit der Aktivitätserhöhung zu vereinbaren ist [9, 62]. Peters *et al.* kommen zu dem Ergebnis einer erhöhten IL-6-Aktivität, welche jedoch keine erhöhte STAT3-Aktivität nach sich zieht und postulieren eine grundlegend gestörte IL-6/STAT3-Achse in CRSwNP [79]. Curcumin, der Hauptinhaltsstoff des Safranwurz (*Curcuma longa*) ist *in vitro* in der Lage dosisabhängig die Proliferation von malignen epithelialen Zellen des Kopf-Halsbereichs zu inhibieren. Interessanterweise führte eine Inkubation mit Curcumin auch zu einer Erniedrigung der JAK2- und pSTAT3 Expression. Die gesamte STAT3-Menge änderte sich nicht. In der zitierten Studie konnte auch eine Erniedrigung der Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) festgestellt werden [119].

## 2.4 Stickstoffmonoxid und Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebiges, gasförmiges Molekül, welches im menschlichen Körper als Signalmolekül wirkt. Erst 1987 entdeckten Ignarro *et al.* und Palmer *et al.* NO, welches sie damals als *endothelium-derived relaxing factor (EDRF)* in Bezug auf seine vasodilatierende Wirkung beschrieben [44, 75]. Produziert wird NO durch die sogenannten Stickstoffmonoxid-Synthasen. Es sind drei Formen dieser NO-produzierenden Enzyme bekannt. Die endotheliale und die neuronale NO-Synthase (eNOS auch NOS3, nNOS auch NOS1) sind konstitutiv exprimiert und werden deshalb zusammenfassend auch als cNOS (eng. *constitutive*) bezeichnet. Die nNOS ist bei vorliegender Fragestellung nicht von Bedeutung und wird daher nicht weiter betrachtet. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS auch NOS2) kann durch verschiedene Zytokine induziert werden und findet sich vornehmlich in Makrophagen. Gemein ist allen Enzymen, dass sie aus der proteinogenen Aminosäure L-Arginin NO und L-Citrullin synthetisieren können. Kofaktoren dieser Reaktion sind Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN), Tetrahydrobiopterin und Häm (Abbildung 2) [7].

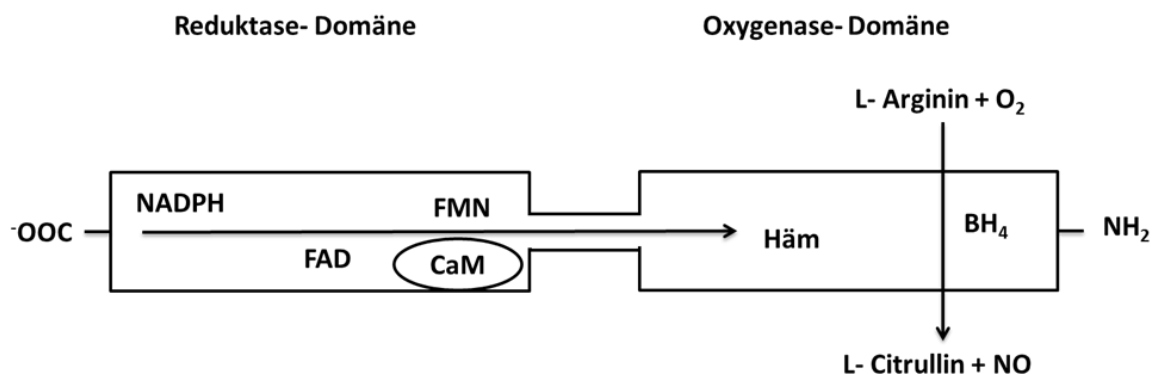


Abbildung 2: Schematisch dargestellter Elektronenfluss in einer Stickstoffsynthase, verändert nach [68]

### 2.4.1 Endotheliale NO-Synthase

#### 2.4.1.1 Lokalisation und Kalzium-Abhängigkeit

Die eNOS wird nicht nur in endothelialen Zellen exprimiert, sondern konnte auch in Kardiomyozyten, Thrombozyten, Mastzellen, renalem Epithel [18, 64], Erythrozyten [56] und Leukozyten [30] nachgewiesen werden. Wichtige Aufgaben des von diesen Zelltypen hergestellten NO sind Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation und antioxidative Effekte im Bereich des Endothels [106]. Auf zellulärer Ebene befindet sich

eNOS entweder im Zytosol in Vesikeln oder in aktivierter Form kovalent über einen Myristoyl-Lipidanker an die so genannten Caveolae der Plasmamembran gebunden [96]. Caveolae sind Invaginationen der Membran, die reich an Cholesterin und Sphingolipiden sind, was für eine verringerte Membranfluidität sorgt. Dies erleichtert Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen [95]. Für seine Aktivierung geht eNOS eine essentielle Wechselwirkung mit einem Kalzium-Calmodulin-Komplex ein. Durch eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums wird Calmodulin aktiviert und ermöglicht eNOS die Entfaltung seiner katalytischen Aktivität durch eine Optimierung des Elektronentransfers [11]. Die katalytische Aktivität eines konstitutiven Enzyms, welches einen interzellulären Transmitter herstellt, eng zu kontrollieren, ist von großer Bedeutung. So sind in Bezug auf die endotheliale NO-Synthase mannigfaltige Kontrollmechanismen bekannt.

#### **2.4.1.2 Phosphorylierung**

Allen voran ist die Phosphorylierung als wichtiger Regulator der katalytischen Aktivität beschrieben. Entscheidende Phosphorylierungsstellen sind Serin-1177 (Ser-1177) und -113, sowie Threonin-495 (Thr-495). Die Phosphorylierung an Ser-1177 wird durch die Proteinkinase B (auch als Akt bekannt) katalysiert. Sie wirkt aktivierend, da sie die Dissoziation des Kalzium-Calmodulin-Komplexes von eNOS inhibiert. Andere Kinasen, darunter die zyklische Adenosinmonophosphat (AMP)-abhängige Proteinkinase (PKA), die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), die Proteinkinase G und die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaM-Kinase II) sind ebenfalls in der Lage die Phosphorylierung zu vollführen; es ist jedoch unklar, wie groß der Anteil der einzelnen Kinasen ist [10, 23, 31, 67]. Inhibitorischen Charakter haben die Phosphorylierungen an den Stellen Ser-113 und Thr-495. Interessanterweise führt die Phosphorylierung durch Proteinkinase C oder AMPK an Thr495 zu einer Schwächung der Calmodulin/eNOS-Interaktion und eine Dephosphorylierung ebenda zu einer verstärkten Interaktion [23, 31].

#### **2.4.1.3 eNOS-Trafficking**

Die oben erwähnte Internalisierung von eNOS in intrazelluläre Vesikel führt zu einer Schwächung der katalytischen Aktivität; anders herum führt eine Verankerung des Proteins an der Plasmamembran zu einer Steigerung der NO-Produktion. Diese regulierende Translokation wird als eNOS-Trafficking bezeichnet. Drei Proteine nehmen hierauf entscheidenden Einfluss: Caveolin-1, *eNOS Interacting Protein* (NOSIP) und *eNOS Trafficking Inducer Protein* (NOSTRIN).

Caveolin-1 ist ein ubiquitär exprimiertes, Membran-assoziiertes Protein [85], welches eine enge Bindung mit dem an der Plasmamembran lokalisiertem eNOS eingeht und seine Aktivität durch Blockierung der Calmodulin-Bindungsstelle dämpft [66]. NOSIP konkurriert mit Caveolin-1 um eine Bindungsstelle an eNOS. Die Bindung von NOSIP hat ebenfalls einen inhibierenden Einfluss auf die NO-Produktion. Darüber hinaus führt die Bindung von NOSIP zu einer Trennung des Enzyms von der Zellmembran im Bereich der Caveolae und erleichtert die zytosolische Verpackung in Vesikeln mit Hilfe des Zytoskeletts [17]. Als weiteres Protein inhibiert NOSTRIN die Bildung von NO. Es bildet einen ternären Komplex mit Caveolin-1 und eNOS; dieser Komplex ist an der Zellmembran lokalisiert [92]. Eine Überexpression von NOSTRIN kann demgegenüber zu einer Loslösung des Enzyms vom Plasmalemm führen und eine Translokation in das Zytosol nach sich ziehen [124]. Im Zytosol ist eNOS nicht Gegenstand einer Ubiquitinylierung, sondern wird über den Golgi-Apparat recycelt und reexprimiert. Es wird vermutet, dass eine NOSTRIN-eNOS-Interaktion auch in diesem Zustand die NO-Produktion vermindert [92]. McCormick *et al.* konnten zeigen, dass in murinen aortalen endothelialen Zellen, die Nostrin-Expression STAT3-abhängig ist. *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) wird auf Endothelzellen exprimiert und führt konstitutiv zu einer STAT3-Aktivierung durch Phosphorylierung an Tyrosin-705. pSTAT3 ist in der Lage die Nostrin-mRNS zu transkribieren, was zu einer erhöhten Nostrin-Expression und einer erniedrigten NO-Produktion führt. Auf der anderen Seite führt in PECAM-*knock-out*-Zellen die verminderte STAT3-Aktivierung zu einer verminderten Nostrin-Expression, was mit einer gesteigerten NO-Produktion einhergeht [65].

#### **2.4.2 Induzierbare NO-Synthase**

Die induzierbare NO-Synthase wurde zuerst in Makrophagen beschrieben. Im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten Formen, kann iNOS durch bestimmte Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , INF $\gamma$ ), oxidativen Stress und bakterielle Bestandteile (Lipopolysaccharide, kurz: LPS) induziert werden. Diese Induktion beschränkt sich nicht auf Makrophagen, sondern kann in nahezu allen Zellen und Geweben stattfinden [26]. Alle Isoformen der NO-Synthasen sind in der Lage Calmodulin zu binden. Bei cNOS ist diese Bindung und somit Aktivierung Kalzium-abhängig. Im Falle der induzierbaren NO-Synthase bindet Calmodulin bei bereits sehr niedrigen Konzentrationen von Kalzium an das Enzym (unter 40nM) [14]. Die Aktivität von iNOS ist also Kalzium-unabhängig. Einmal induziert, produziert das Enzym Stickstoffmonoxid, bis der Stimulus durch Zytokine sistiert; als

endogener Inhibitor der iNOS-Expression ist Endothelin-1 bekannt [6]. Auch unterscheiden sich die Mengen der NO-Produktion beträchtlich. cNOS produziert Mengen im nanomolaren Bereich über Sekunden bis Minuten, wohingegen iNOS in der Lage ist über Stunden und Tage NO im mikromolaren Bereich herzustellen [111].

## **2.5 Stickstoffmonoxid als Signaltransmitter**

Stickstoffmonoxid als gasförmiger Botenstoff kann auf zwei Wegen seine vielfältigen physiologischen Aufgaben erfüllen: zum einen über einen zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-abhängigen Weg, zum anderen über einen cGMP-unabhängigen Weg. Welche Art und Weise der Wirkung überwiegt, hängt von Ort und Höhe der Produktion ab (vgl. Abb. 3).

### **2.5.1 Der cGMP-abhängige Weg**

Dieser Weg kommt vor allem im Endothel und in Thrombozyten zum Tragen und erfordert nur Mengen im nanomolarem Bereich. Stickstoffmonoxid diffundiert über das Endothel in die Tunica media der Gefäße oder in Thrombozyten und bindet hier an die lösliche Guanylatcyclase, welche es durch kovalente Bindung an dem zentralen Häm-Eisen des Enzyms aktiviert. Diese ist nun in der Lage aus Guanosintriphosphat (GTP) cGMP herzustellen, welches als Mediator (*second messenger*) wirkt. Hierbei ist zu betonen, dass ein Molekül Guanylatcyclase mehrere hundert Reaktionen katalysieren kann. Man spricht von einem Verstärkereffekt, wodurch auch verständlich wird, dass NO-Mengen im nanomolaren Bereich ausreichend sind, um eine Wirkung zu vermitteln. Zelluläre Ziele von cGMP sind Ionenkanäle, Phosphodiesterasen und Proteinkinasen, insbesondere die cGMP-abhängige Proteinkinase G [29]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Aktivierung dieses Signalwegs zu glatter Muskelrelaxation, Vasodilatation und verminderter Thrombozytenaggregation [16] führt.

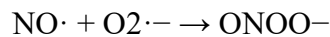
### **2.5.2 Der cGMP-unabhängige Weg**

NO ist darüber hinaus in der Lage direkt Schwefelatome in Cysteinresten zu nitrosylieren. Beschrieben ist dieses Phänomen unter anderem am Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B. Diese S-Nitrosylierung führt zu einer Inhibierung des Proteins und zu einem Verlust seiner Funktion als Transkriptionsfaktor, was NF $\kappa$ B zu einem redoxsensitivem Transkriptionsfaktor macht [38]. I $\kappa$ B, der zytosolische Inhibitor von NF $\kappa$ B, wird unter NO-Stimulation vermehrt exprimiert; er ist ebenfalls Transkriptionsziel von NF $\kappa$ B im Sinne einer negativen Rückkopplung. An zwei Cysteinresten nitrosyliert eNOS sich auch

selber, was zu einer Translokation in das Zytosol und zu einer Hemmung der katalytischen Aktivität führt [20].

Weiter bildet NO in wässriger Lösung mit Hyperoxid-Anion die reaktive Stickstoffspezies Pentoxinitrit:

**Formel 1: Hyperoxid-Anionbildung**



Für die Bildung dieses Moleküls muss allerdings die Bildung vom Hyperoxid-Anion und von Stickstoffmonoxid stark erhöht sein, wobei ersteres physiologisch der limitierende Faktor ist. Pentoxinitrit reagiert mit ubiquitärem Kohlenstoffdioxid zum Nitrosoperoxy-carbonat-Ion, welches in zwei hochreaktive Spezies zerfällt, die für den DNS-schädigenden Effekt vom Pentoxinitrit verantwortlich sind [13].

**Formel 2: Bildung hochreaktiver DNS-schädigender Spezies**



Demgegenüber ist Pentoxinitrit hochwirksam gegen internalisierte Pathogene und ein potenter Aktivator der Apoptose durch Cytochrom-c Nitrosylierung [21, 93].

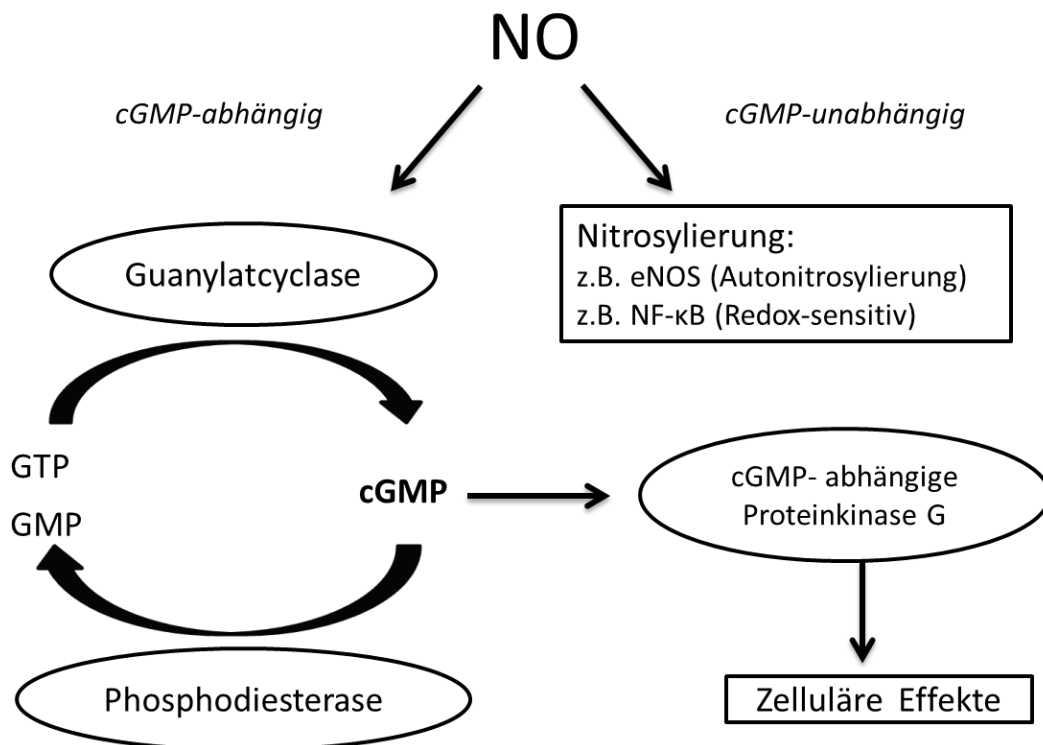


Abbildung 3: Schematische Darstellungen der zwei Wirkungsweisen von NO im menschlichen Organismus, verändert nach [29]

## 2.6 Apoptose und Caspasen

Die Apoptose wird als so genannter „programmierter Zelltod“ bezeichnet. Sie ist ein physiologischer Vorgang, der beim Zellumsatz, der Entwicklung und Funktion des Immunsystems, Hormon-abhängiger Atrophie und embryonaler Entwicklung eine wichtige Rolle spielt. Ganz im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein Energie-abhängiger Vorgang, der nicht zur entzündlichen Reaktionen führt, da das Plasmalemma der Zelle stets intakt bleibt, bis zur Phagozytose durch Gewebsmakrophagen. Morphologisch ist dieser Vorgang zunächst durch Karyopyknose (Kernschrumpfung) und Karyorrhexis (Zellfragmentierung) durch Chromatinkondensation gekennzeichnet. Im Zytoplasma ist eine Vakuolisierung erkennbar. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Fragmentierung der ganzen Zelle, wobei die Plasmamembran jedoch integer bleibt. Diese Zellfragmente werden schließlich durch Makrophagen internalisiert.

Wichtige Effektorproteine dieses Vorgangs nennt man *Cysteine-dependent Aspartate-specific Proteases* (Caspasen). Caspasen sind in der Lage nach ihrer Aktivierung Proteine an Aspartatresten zu schneiden und sie somit abzubauen, was ein wichtiger Vorgang im Rahmen der Apoptose ist. Die Aktivierung dieser Proteine kann extrinsisch (Caspase-8 und 10) oder intrinsisch erfolgen (Caspase-9). Beide Wege münden in einen gemeinsamen Endweg, welcher durch die Aktivierung der Caspasen-3, -6 und -7 gekennzeichnet ist. Ein Stimulus für den extrinsischen Weg der Apoptose ist unter anderen die Bindung des Zytokins Fas an seinen Rezeptor, ein weiteres Beispiel ist die Bindung des TNF $\alpha$  an seinen Rezeptor. Demgegenüber wird der intrinsische Weg entweder durch das Wegfallen eines anti-apoptotischen Wachstumsfaktors oder durch Umwelteinflüsse wie Hyperthermie oder Strahlung ausgelöst. Beide Möglichkeiten führen zu einer Porenöffnung in der inneren Mitochondrienmembran und zu einer Freisetzung von Cytochrom c, welches in der Lage ist Caspase-9 zu aktivieren [19].

### **3 Fragestellung der Arbeit**

Stickstoffmonoxid nimmt im menschlichen Organismus als Signalmolekül vielfältige Aufgaben wahr. Neben den zunächst beschriebenen Funktionen der Regulation des Vasotonus und der Hemmung der Thrombozytenaggregation kommen ihm vor allem immunmodulatorische und Zellvitalitäts-vermittelnde Rollen zu. In hohen Konzentrationen kann NO als Mittel der angeborenen Immunantwort parasitäre, virale und bakterielle Pathogene abwehren, aber auch durch die Bildung nitrosativer und oxidativer Spezies gewebebeschädigend wirken. Die Produktion von NO übernehmen im menschlichen Organismus die NO-Synthasen. In dieser Arbeit soll im ersten Schritt die Expression und Aktivierung von eNOS und deren Regulatoren (Nostrin, Caspase-8) auf RNS- und Proteinebene charakterisiert, wobei Unterschiede zwischen polypösem Gewebe und korrespondierender unterer Nasenmuschel herausgearbeitet werden. Zusätzlich wird der Transkriptionsfaktor STAT3, welcher in polypösem Gewebe von CRSwNP-Patienten erhöht ist, untersucht. In einem zweiten Schritt erfolgt die Betrachtung polypösen Gewebes unter Behandlung mit Cineol. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf den Phosphorylierungsstellen (Aktivierung) in Bezug auf die Gesamtexpression genannter Proteine. Dabei wird konkret die Frage gestellt, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression und dem Phosphorylierungsstatus von eNOS und STAT3 in CRSwNP gibt und inwieweit Cineol diesen Zusammenhang beeinflussen kann.

Durch Aufzeigen der Wirkungsweise des Phytotherapeutikums Cineol auf den eNOS-Metabolismus sollen Grundlagen für neue Therapiemöglichkeiten der CRSwNP aufgezeigt werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Puffer und Lösungen

1M Tris HCl pH 8,8

1M Tris-hydrochlorid- HCl  
pH 8,8

1M Tris HCl pH 6,8

1M Tris-hydrochlorid- HCl  
pH 6,8

10x Elektrophorese SDS- Ladepuffer

1,92 M Glycin  
250 mM Tris  
1% SDS

1x Transferpuffer

20 % Methanol  
25mM Tris  
192 mM Glycin

20x Tris- gepufferte Salzlösung (TBS)

0,4 M Tris  
2,74 M NaCl  
pH 7,6 einstellen

4% SDS Ladepuffer

25 % Tris HCl pH 6,8  
8% SDS  
40% Glycerol (99,5%)  
20 %  $\beta$ - Mercaptoethanol  
0,004 % Bromphenolblau

### 4.2 Reagenzien

Antikörperverdünnungspuffer

DCS Innovative Diagnostik-  
Systeme GmbH, Hamburg

Aprotinin

Sigma- Aldrich Chemie GmbH,  
Steinheim

APS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAN- Biotech GmbH & Co., Aidenbach
Bradford Quickstart 1x Dye Reagez	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
ECL-Entwicklerlösung	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 100-, 96-, 70-, 50 %, vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid 10 mg/mL	Invitrogen™ AG, Carlsbad, CA, USA
Faramount Aqueous Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Methylenblau (Lösung nach Löffler)	Apotheke Universität zu Lübeck
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Elektrophoresis GmbH, Heidelberg

Natronlauge 4N	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
dNTP Mix, 10 mM	Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, USA
Paraformaldehyd (PFA), 16%	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA
Pepstatin A 2mg/mL	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Peroxidase Label (HRP) Avidin- Biotin- Complex	DCS Innovative Diagnostik- Systeme GmbH, Hamburg
Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphatase- Inhibitor - Cocktail (PIC)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polyacrylamid, 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PonceauS – Lösung für Elektrophorese, 0,2 %	Serva, Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
RNAse-freies Wasser	Quiagen GmbH, Hilden
Standard PCR- Puffer	Quiagen GmbH, Hilden
Stripping Puffer	Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, USA
TagDNA Polymerase, 5 U/ $\mu$ L	Quiagen GmbH, Hilden
TaqMan Gene Expression Mastermix®	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Trisbase	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasser (doppelt destilliert), Sterling Berkefeld® Anlage	Berkefeld-Filter AnlagenbauGmbH, Celle

Wasser, Nuklease-frei

Thermo Fischer Scientific Inc.,  
Rockford, USA

### 4.3 Kits

Human Phospho-Kinase Antibody Array

R&D System, Inc.,  
Minneapolis, Minnesota, USA

Human NOS2/iNOS ELISA Kit

LifeSpanBioScience, Seattle,  
Washington, USA

Nitric Oxide Assay Kit (Calorimetric)

Abcam®, Cambridge, Vereintes  
Königreich

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

Thermo Fischer Scientific Inc.,  
Rockford, USA

RNeasy Plus Mini Kit

Quiagen GmbH, Hilden

TaqMan™ Array Human eNOS Signaling

Thermo Fischer Scientific Inc.,  
Rockford, USA

### 4.4 Antikörper

Folgenden Tabellen zeigen die für die Experimente verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen.

**Tabelle 2: Primärantikörper**

Primärantikörper	Firma	Verdünnung
anti-eNOS, Kaninchen anti human	Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA	1:1000
anti-peNOS(1177), Kaninchen anti human	Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA	1:1000
anti-STAT3, Kaninchen anti human	Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA	1:1000
anti-pSTAT3 (705), Kaninchen anti human	Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA	1:1000
anti-Caspase-8, Kaninchen anti human	Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA	1:1000
anti-GAPDH, Kaninchen anti human	Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA	1:1000
anti-β-Aktin, Kaninchen anti human	Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA	1:1000
anti-Nostrin, Kaninchen anti human	Abcam®, Cambridge, Vereintes Königreich	1:500

**Tabelle 3: Sekundärantikörper**

Sekundärantikörper	Firma	Verdünnung
Ziege anti Kaninchen, HRP-gekoppelt	Sigmar-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	1:50.000
Maus anti Kaninchen, HRP- gekoppelt	Sigmar-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	1:50.000

## 4.5 Gewebe

Für diese Arbeit wurde das Gewebe von insgesamt 35 Patienten verwendet. Jeder Patient ist über eine Nummer definiert. Die unten stehende Tabelle gibt weitere Angaben bezüglich der Probanden, wie das Alter bei Operation und relevante Komorbiditäten. Darüber hinaus ist ersichtlich für welches Experiment die Gewebe der Probanden verwendet wurden. Im Kapitel 5 (Ergebnisse) wird genauer beschrieben, welche Proben welches Probanden für welches Experiment genutzt wurden und ob eine Behandlung mit Cineol stattfand.

**Tabelle 4: Gewebe und Verwendung in dieser Arbeit**

Patient	Alter bei Operation	Geschlecht	Verwendung	Asthma bronchiale
1	unbekannt	m	Microarray	Keine Angaben (k.A.)
2	37	w	Microarray	nein
3	41	m	Microarray	nein
4	58	m	Microarray	ja
5	36	m	Microarray	nein
6	55	m	Microarray	nein
7	59	m	Microarray	nein
8	72	m	Microarray	nein
9	53	m	Western Blot, Phosphokinasearray Immunfluoreszenz	k.A.
10	31	m	Western Blot, Phosphokinasearray, Immunfluoreszenz	k.A.
11	48	m	Western Blot, Phosphokinasearray, Immunfluoreszenz	k.A.
12	25	w	Western Blot, Immunfluoreszenz	k.A.
13	58	m	Western Blot, Phosphokinasearray, Immunfluoreszenz	k.A.
14	41	m	Western Blot, Phosphokinasearray, Immunfluoreszenz	k.A.
15	25	m	Western Blot	ja
16	46	w	Western Blot	ja
17	50	w	Western Blot	ja
18	54	w	Phosphokinasearray	nein
19	69	w	Phosphokinasearray	nein
20	60	m	Phosphokinasearray	nein
21	23	m	Western Blot	nein

22	42	m	Phosphokinasearray, RT-PCR	nein
23	60	m	RT-PCR	nein
24	75	w	Phosphokinasearray, iNOS, RT-PCR	ja
25	37	m	iNOS-ELISA	nein
26	53	w	iNOS-ELISA	nein
27	55	m	Western Blot, iNOS-ELISA	nein
28	68	w	Western Blot, iNOS-ELISA	nein
29	57	m	Western Blot, iNOS-ELISA	nein
30	56	w	Western Blot, iNOS-ELISA	nein
31	71	w	Western Blot, iNOS-ELISA	nein
32	42	m	Western Blot, iNOS-ELISA, NO-Messung	nein
33	32	m	Western Blot, iNOS-ELISA, NO-Messung	ja
34	75	w	Western Blot, iNOS-ELISA, NO-Messung	ja
35	63	m	Western Blot, iNOS-ELISA, NO-Messung	nein

#### 4.6 Geräte

Allegra 25R Zentrifuge

Beckman Coulter GmbH,  
Krefeld

Biofuge Fresco 21

Heraeus Instruments GmbH,  
Hanau

BioPhotometer

Eppendorf AG, Hamburg

Durchlichtmikroskop

Bresser, GmbH, Rhede

Elektrische Pipettierhilfe LHP-PH01

Phoenix Instrument GmbH,  
Garbsen

Elektrophoresis Power Supply EPS 600

GE Healthcare Europe GmbH,  
Freiburg

Elektrophoresis Power Supply EPS 601

GE Healthcare Europe GmbH,  
Freiburg

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M

Carl Zeiss AG, Oberkochen

Fusion FX7

Vilber Lourmat GmbH,  
Eberhardzell

Geldokumentationssystem Gel Doc XR

Bio-Rad Laboratories GmbH,  
München

Kryostat CM 3050S

Leica Microsystems GmbH,  
Wetzlar

Lightcycler® 96	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Whylen
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mastercycler Ep Gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowelle Privileg 8020	IRE Beteiligung GmbH, Stuttgart
Mikroliterpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
MS1 Minishaker IKA®, Vortexer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mini-Zentrifuge Sprout	BioLab Products, Hamburg
NanoDrop® 2000 Spectrometer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH- Meter766, Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH und Co. KG, Berlin
Power Pac HC™ Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ThermoShaker Ts1	Biometra GmbH, Göttingen
Waage KERN EW620-3NM	Kern und Sohn GmbH, Balingen

#### **4.7 Weitere Materialien**

Becherglas (10mL, 25mL, 400 mL, 500 mL)	Duran Group GmbH, Wertheim/Main
Cooling Unit	
Gießapparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glasflaschen (100mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL)	Duran Group GmbH, Wertheim/Main
Erlenmeyerkolben (1000mL, 250 mL, 100 mL)	Duran Group GmbH, Wertheim/Main
Färbebehälter	
Ohne Riffeln, Assistent	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön

Klein, mit Riffeln	Duran Group GmbH, Wertheim/Main
Messzylinder (250 mL, 100 mL)	VITLAB GmbH, Großostheim
MiniPROTEAN® Comb, 10- well/15- well	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MiniPROTEAN® System Glas Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pinsel	
PTFE Kämme	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MiniPROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Schnittstrecker (Glaseinsatz 70 mm)	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Spacer Plates 7,5- , 15 mm München	Bio-Rad Laboratories GmbH,
Taumler, ST5 CA	neoLAB Migge Laborbedarf Betriebs GmbH, Heidelberg
Trichter	VITLAB GmbH, Großostheim
<b>4.8 Software</b>	
Axio Vision Rel. 4.8	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Fusion Bio- 1D V12.14	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
GraphPad Prism® Version 5	GraphPad Software Inc., La Jolle, CA, USA
Image J	National Institute of Health, Maryland/Bethesda, USA
LightCycler®96 SW1.1	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Microsoft Office	Redmount, WA, USA
NanoDrop 1000 V3.8.0	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Quantity One® Version 4.6.6	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA

## **4.9 Isolation des Gewebes aus dem Patienten**

Die Patienten wurden chirurgisch in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikum Schleswig- Holstein auf dem Campus Lübeck behandelt. Aus der Tabelle auf Seite 25 ist ersichtlich, dass 7 der 35 Patientin an einer asthmatischen Erkrankung litten, wobei zu 7 Patienten keine Angabe diesbezüglich gemacht werden kann. Das untersuchte Gewebe bestand aus nasalen Polypen und der Schleimhaut der unteren Nasenmuschel (Concha nasalis inferior, Os turbinatum).

Das frische Gewebe wurde sogleich nach der Exstirpation für 24 h Stunden in der entsprechenden Cineolkonzentration und einer Mediumkontrolle (Dulbecco's Modified Eagle Medium, kurz: DMEM) bei 10% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert und nach dieser Zeit bei -80°C bis zur Protein- und RNS- Isolation tiefgefroren.

## **4.10 Molekularbiologische Methoden**

### **4.10.1 Microarray-Analyse**

Die tiefgefrorenen Gewebeproben wurden auf Eis zu Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) geschickt, um dort eine *Whole Genome Microarray* (4x44K)-Analyse durchzuführen. Die RNS wurde dort nach Standardprotokollen mit Trizol extrahiert und ihre Güte mit der *Agilent 2100 Bioanalyzer platform* (*Agilent Technologies*) kontrolliert. Die *RNA integrity number (RIN)* wurde errechnet und RNS mit Werten über 6 wurden genutzt [22]. Zur Analyse der Daten wurde das Rosetta Resolver<sup>®</sup> Analyse System genutzt (Rosetta Biosoftware). Die Microarray- Experimente sind konform mit der „minimalen Information über ein Microarray Experiment“, einem Qualitätsstandard für Microarray- Experimente.

### **4.10.2 RNS- Isolation aus humanem Gewebe**

Die Isolation von Ribonukleinsäure (RNS) erfolgte jeweils aus einem 20-40 mg schweren Gewebestück. Zerkleinert wurde das Gewebe mit dem Tissue Mater 125<sup>®</sup> Homogenisator (Omni International, Kennesaw, GA, USA); infolgedessen wurde das Gewebe in 300 µL RLT- Puffer /1% Mercaptoethanol aufgenommen.

Die Gesamt-RNS-Menge wurde mit Hilfe des RNeasy<sup>™</sup> Plus Mini Kit (Quiagen GmbH, Hilden) isoliert; es wurde entsprechend der Herstellerangaben vorgegangen. Das homogenisierte Gewebe wurde auf die QiaShredder-Säule gegeben und zwei Minuten bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert, daraufhin wurde die Säule verworfen und der Durchfluss mit etwaigen Präzipitaten auf eine genomische Desoxyribonukleinsäure

(gDNS) Eliminator Spin Säule zur Entfernung der genomischen DNS pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte für 30 Sekunden bei 9600 g. Zum Präzipitieren der RNS erfolgte die Zugabe einer äquivalenten Menge 70%igem Ethanol (300 µL) zu dem Durchfluss. Die 700 µL wurden folglich auf eine RNeasy Spin Säule gegeben und 15 Sekunden bei 9600 g zentrifugiert. Dies führte zur Bindung der RNS an die Membran der Säule. Um die unspezifische Bindung von Kohlenhydraten, Proteinen und Fettsäuren an der Membran zu verhindern, folgten drei Waschschrte bei jeweils 9600 g. Der erste Waschschrte mit 600 µL RW1- Puffer für 15 s und die folgenden zwei mit 500 µL RPE- Puffer für erstens 15 Sekunden und zweitens zwei Minuten. Der Durchfluss wurde stets verworfen. Nach diesen Waschschrten folgte die Auswaschung der isolierten RNS durch 30 µL RNSase-freies Wasser. Dazu wurde die Membran in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß platziert und für eine Minute bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Um eine maximale Ausbeute zu erreichen, wurde dieser Schrt mit dem RNS- Eluat wiederholt.

#### **4.10.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Für die Konzentrationsbestimmung der eluierten RNS wurde das Gerät Nano Drop® Spektrometer (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet. Hierfür wurde die Extinktion von 1 µL Eluat bei 260 nm bestimmt. Beträgt die Extinktion 1, entspricht dies einer Konzentration von 40 ng/µL. Um die Reinheit der isolierten RNS zu beurteilen, wurden zwei Quotienten herangezogen. Einerseits der  $A_{260/280}$ -Quotient, der bei RNS um 2 liegen sollte, um die Abwesenheit vom Proteinen, deren Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt, im Eluat zu garantieren; andererseits der  $A_{260/230}$ - Quotient, der zwischen 2 und 2,2 liegen muss, um die Abwesenheit von Salzen und Kohlenhydraten anzuzeigen.

#### **4.10.4 cDNS- Synthese**

Die Synthese von *Copmlementary(c)*DNS-Synthese aus *messenger(m)*RNS findet mit Hilfe einer reversen Transkription statt. Daraufhin können bestimmte Genabschnitte mit Hilfe der PCR vervielfältigt werden und es kann auf ihre Expression auf Genebene rückgeschlossen werden.

Für den *Human eNOS Signaling TaqMan® Array* wurde die cDNS-Synthese mit dem Revert Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) durchgeführt, wobei 1 µg RNS je Probe angesetzt wurde. Pro Ansatz wurde 1 µL *Random Hexamer Primer* hinzugegeben, mit RNSase-freiem Wasser auf 12µL aufgefüllt und das Reaktionsgemisch für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden die in Tabelle

3 zu sehenden Komponenten in angegebenen Mengen hinzu pipettiert. Bei der Negativkontrolle wurde die Reverse Transkriptase durch RNSase-freies Wasser ersetzt.

**Tabelle 5: Materialien der cDNS-Synthese**

Komponente	Volumen mit RT	Volumen ohne RT
5x Puffer	4 µL	4 µL
Ribonuklease-Block	1 µL	1 µL
dNTP- Mix	2 µL	2 µL
reverse Transkriptase	1 µL	1 µL RNase-freies Wasser

Das Endvolumen betrug 20 µL und die reverse Transkription wurde mit Hilfe der folgenden Schritte durchgeführt.

**Tabelle 6: Ablauf der cDNS-Synthese**

Zeit in Minuten	Temperatur in Grad Celsius
5	25
60	42
5	70
∞	4

Die fertiggestellte cDNS wurde bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### 4.10.5 Quantitative real-time PCR

Bei der Methode der qPCR erfolgt neben einer Vervielfältigung des interessierenden Genabschnitts auch eine quantitative Messung durch Fluoreszenzintensität in Echtzeit. Nach exponentieller Vervielfältigung der Genabschnitte übersteigt die Fluoreszenz nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen das Hintergrundsignal, womit das Signal detektiert und positiv wird. Es wurde der *TaqMan® Expression Array eNOS signaling* verwendet.

Sonden dieses Arrays tragen am 5'-Ende einen so genannten Reporter-Fluoreszenzfarbstoff, dessen Signal im ungebundenen Zustand und auch nach Hybridisierung mit dem komplementären cDNS-Abschnitt durch den am 3'-Ende-liegenden Quencher (eng. *to quench*-löschen) unterdrückt wird. Erst wenn im Rahmen der Elongation die Sonde durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut wird, dissoziiert der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und sein Signal wird nicht mehr unterdrückt. Es kann bei den Wellenlängen 470/514 nm gemessen werden.

Für den Ansatz der qRT-PCR wurden folgende Reagenzien verwendet, wobei die Taq-Man®-Sonden für die bestimmten Gene bereits auf der 96-well-Platte bereits vorgelegt waren.

**Tabelle 7: Komponenten für den eNOS signaling array**

Komponente	Volumen
cDNA (6ng)	x
DEPC- Wasser	auf 9 µL auffüllen
TaqMan- Sonde	1 µL bereits vorgelegt
TaqMan- Mastermix	10 µL
	<b>Summe: 20 µL</b>

Für die Genexpressionsanalyse wurde die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode verwendet. Dabei wurde die Expressionsveränderung des Gens auf ein vom Hersteller genanntes *housekeeping*-Gen (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase [GAPDH]) betrachtet und relativ quantifiziert. Der  $C_T$ -Wert des betrachteten Gens wurde vom  $C_T$ -Wert des Kontrollgens abgezogen und somit normalisiert.

**Formel 3: Ermittlung des  $\Delta C_T$ -Wertes**

$$\Delta C_T = C_T (\text{Probe}) - C_T (\text{GAPDH})$$

Der so errechnete  $\Delta C_T$ - Wert beschreibt wie viele Amplifikationszyklen im Vergleich zur Referenz mehr oder weniger benötigt wurden, um die gleiche Menge zu erhalten. Je größer der  $\Delta C_t$ -Wert, desto weniger Zielgen ist im Vergleich zum Kontrollgen in der Probe vorhanden. Nun wurden die einzelnen  $\Delta C_T$ -Werte der mit Cineol unbehandelten und behandelten Polypen voneinander subtrahiert, um den sogenannten  $\Delta\Delta C_T$ - Wert zu erhalten.

**Formel 4: Ermittlung des  $\Delta\Delta C_T$ -Wertes**

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{behandelten Polyp}) - \Delta C_T (\text{unbehandelter Polyp})$$

Es folgte die Berechnung der relativen Häufigkeit mit Hilfe folgender Formel:

**Formel 5: Ermittlung der relativen Häufigkeit**

$$\text{Relative Häufigkeit} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Werte über 1 bedeuten, dass in den behandelten Polypen diese Gene hochreguliert sind im Vergleich zum unbehandelten Polypen. Herunterreguliert sind dem zufolge Gene mit einem Wert unter 1.

## 4.11 Biochemische Methoden

### 4.11.1 Western Blotting

Die Methode *Western Blotting* ermöglicht es mithilfe von Antikörpern einzelne Proteine quantitativ zu betrachten. Zuvor müssen diese mit Hilfe einer Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Anschließend werden die Proteine auf eine Membran übertragen, wobei ihr aufgetrenntes Muster und insbesondere ihre Immunreaktivität erhalten bleiben. Per Primärantikörperbindung kann nun das Zielprotein markiert werden, woraufhin an diesem die Sekundärantikörperbindung erfolgen kann. Durch die Kopplung des Sekundärantikörpers mit Meerrettichperoxidase (engl. *Horseradish peroxidase*, kurz: HRP), ist eine chromogene Detektion des Zielproteins möglich. Genauer wird hier ein Dioxetan durch HRP in seine oxidierte Form überführt, dessen Lumineszenz detektiert wird.

#### 4.11.1.1 Proteinisolation aus Gewebe

Das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorene Gewebe wurde in  $300\ \mu\text{L}$  Lysispuffer mit den entsprechenden Enzyminhibitoren (s. Tabelle 8) aufgenommen und in einer Mörserschale mit Hilfe eines Pistills zerkleinert. Anschließend wurde die Gewebesuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde auf einem Schwenker bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei  $9600\ \text{g}$  für 10 Minuten, woraufhin das Sediment verworfen und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß der Proteinkonzentrationsbestimmung zugeführt wurde.

Tabelle 8: Enzyminhibitoren im Lysispuffer mit Endkonzentration

Inhibitor	Endkonzentration
Aprotinin	$30\ \mu\text{g}/\text{ml}$
PMSF*	$1\ \text{mmol}/\text{L}$
Pepstatin A	$1\ \mu\text{g}/\text{mL}$
Natriumfluorid	$10\ \text{mmol}/\text{l}$
Phosphatase Inhibitor <i>Cocktail</i>	$10\ \mu\text{L}/\text{mL}$

#### 4.11.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Beim Bradford-Test bindet das Molekül Coomassie Blue an die Seitenketten alkalischer Aminosäuren, sodass sich das Absorptionsmaximum der Proteine von  $470\ \text{nm}$  zu  $595\ \text{nm}$  in gebundenem Zustand verschiebt. Nach einer 1:40-Verdünnung des Proteinlysats wurden  $5\ \mu\text{L}$  der Suspension mit  $250\ \mu\text{L}$  Bradford- Reagenz vermischt und zehn Minuten in Dunkelheit inkubiert. Infolgedessen wurde die photometrische Messung der Absorption bei  $595\ \text{nm}$  durchgeführt (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg).

#### 4.11.1.3 SDS- Gelpräparation

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteinlysate wurden eigene 7,5- und 10%-Acrylamid-haltige Gele gegossen. Erstere für die Auftrennung größerer Proteine bis 100 kDa, letztere für kleinere Proteine. Dafür wurde das noch flüssige Gel in eine zuvor mit Ethanol gereinigte Gießapparatur gegossen und mit hundertprozentigem Ethanol überschichtet. Nach Aushärtung erfolgte die Überschichtung mittels Sammelgel, in welches ein Kamm eingelassen wurde, um die Kammern für die Proteinladung zu generieren. Für die genauere Zusammensetzung der Gele vgl. Tabelle 9.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele

	Trenngel		Sammelgel
	7,5% Polyacrylamid	10% Polyacrylamid	10% Polyacrylamid
<b>1M Tris-HCl pH 8,8</b>	2 mL	2mL	0mL
<b>1M Tris-HCl pH 6,8</b>	0mL	0mL	0,3mL
<b>1%SDS</b>	0,5mL	0,5mL	0,25mL
<b>Polyacrylamid</b>	1,2mL	1,65mL	0,35mL
<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	1,3mL	0,85mL	1,6mL
<b>APS</b>	50µL	50µL	25µL
<b>TEMED</b>	5µL	5µL	2,5µL

#### 4.11.1.4 SDS- Gelelektrophorese

Als anionisches Detergens denaturiert Sodiumdodecylsulfat (SDS) Proteine und ist in der Lage die eigentliche Ladung des Proteins durch eine anionische Ladung zu maskieren. Polyacrylamid, welches im Gel enthalten ist, bildet bei der Polymerisierung eine netzartige Struktur. Diese beeinflusst die Migration der Proteine entlang eines elektrischen Gradienten, wodurch diese ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Bei Anlegen einer Spannung von 80V an das Gel wandern die Proteine zuerst in das weitmaschige pH-neutrale Sammelgel. Sie wandern Richtung Anode, wobei das Glycin, welches im Ladepuffer enthalten ist, sie leicht zurückhält. Nachdem an der Grenze zum Trenngel alle Proteinmoleküle konzentriert wurden, wandern sie gemeinsam bei 120V in das engmaschigere Trenngel. Da hier ein basischer pH-Wert existiert, wird Glycin zum Glycinat-Anion reduziert. Dieses Salz der kleinsten proteinogen Aminosäure wandert nun schneller als alle Proteine Richtung Anode. Die Proteine werden entsprechend ihrer Größe im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteinlysate wurden 1:3 mit 4xSDS-Ladepuffer gemischt und vor Beginn fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Stets wurden 35 µg des Proteins aufgetragen und 7 µL des peqGOLD Proteinmarker V (PeqLab Biotechnologies

GmbH, Erlangen). Nach Auslaufen des Laufpuffers mit den Glycinat-Anionen, wurde die SDS- Gelelektrophorese abgebrochen.

#### **4.11.1.5 Proteintransfer**

Um die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren, wurde die Tank-Blot-Methode verwendet. Bei 100 V erfolgte der Transfer für 60 Minuten, sodass auch größte Moleküle bis 140 kDa komplett transferiert wurden. Die Bindung der Proteine an der Nitrocellulosemembran erfolgt durch polare und ionische Wechselwirkungen. Anschließend wurde für eine Minute mit Ponceau-S-Lösung inkubiert, um die Transfereffizienz zu überprüfen. Die Proteinbanden wurden durch Waschen mit destilliertem Wasser sichtbar, wodurch auch etwaige schiefe Banden und Luftblasen erkennbar wurden. Waschen mit *tris-buffered saline* (TBS) im Anschluss entfernte die Ponceau-S-Lösung komplett.

#### **4.11.1.6 Proteindetektion mittels spezifischer Antikörper**

Um unspezifische Bindungsstellen der Proteine zu blockieren, wurde die Membran eine Stunde in 5% BSA mit TBS-T (0,1% Tween) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen für je fünf Minuten mit TBS erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Die Verdünnung war eindeutig vom Hersteller vorgegeben (siehe Tabelle 2). Der Sekundärantikörper wurde in gleichem Puffer wie der Primärantikörper angesetzt. Nach erneutem fünfmaligen Waschen für fünf Minuten in TBS, wurde die Membran eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Verdünnung betrug hier stets 1:50.000.

Vor dem Entwickeln des Blots stand ein erneutes fünfmaliges Waschen mit TBS. Anschließend wurde die Membran für eine Minute mit der Elektrochemielumineszenz-Lösung im Dunkeln inkubiert und die Signale mit dem FusionFX-7 detektiert. Die Banden wurden mit dem Programm Quantity One quantifiziert und daraufhin auf das *Housekeeping*-Protein GAPDH normalisiert.

#### **4.11.2 Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

ELISA bezeichnet ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren von Antigenen. Es basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion. Beim Sandwich-Elisa wird ein erster Antikörper an eine Festphase am Boden einer Titerplatte gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in der Reaktionskammer der Platte inkubiert. Es folgt die zweite Inkubation mit einem weiteren Antikörper, welcher ein vom ersten Antikörper verschiedenes Epitop erkennt und mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Dieses Enzym

ist in der Lage 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindiimin umzuwandeln, welches nach der zweiten Antikörperinkubation zu dem Gemisch zugegeben wird. Das Diimin fluoresziert nach Hinzugabe einer Stopplösung, die Schwefelsäure enthält. Je mehr Antigen in der Probe war, desto stärker ist die Fluoreszenz ausgeprägt, welche mit einem Photometer bei 450 nm gemessen werden kann.

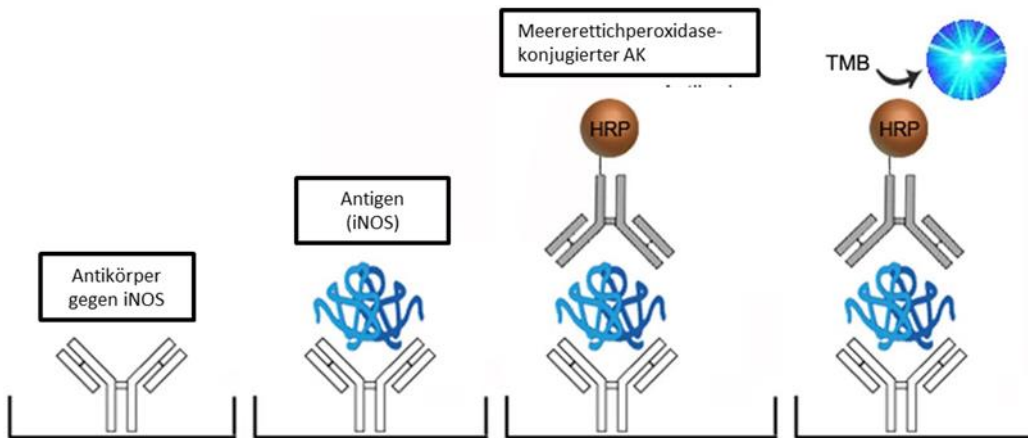


Abbildung 4: möglicher schematischer Ablauf eines Sandwich-ELISAs

Tabelle 10: Ablauf des iNOS-ELISAs

Prozedur: Hinzugeben von...	Menge (µL)	Dauer/Inkubation
Proben	100	1 h
Reagenz A	100	1 h
Waschpuffer	350	3 x 1 min
Reagenz B	100	30 min
Waschpuffer	350	5 x 1 min
TMB-Substrat	90	15 min
Stopplösung	50	∞

Für den iNOS-ELISA wurden in dieser Arbeit 320 µg lysiertes Protein pro Mikrotiterplatte eingesetzt. Diese waren in Lysispuffer mit zugegebenen Inhibitoren gelöst. Bei jedem Experiment wurde eine Standardkurve mit Doppelwerten und zwei Negativkontrollen nach Herstellerangaben erstellt. Auch wurde jede Probe als Doppelwert geführt. Die Abbildung 5 zeigt eine repräsentative Standardprobe.

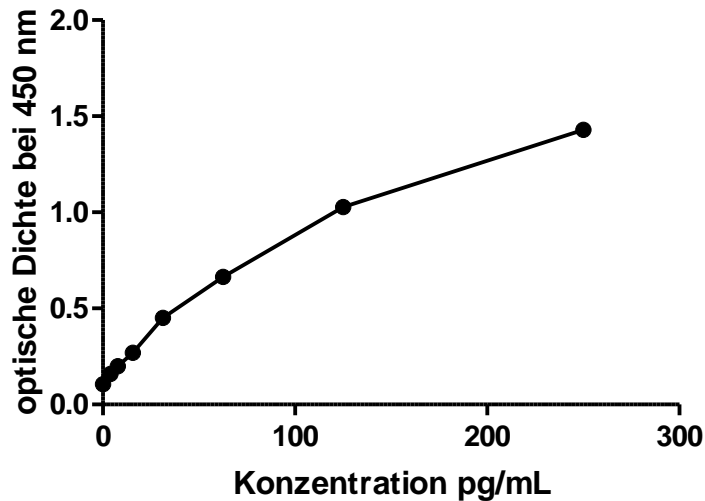


Abbildung 5: Repräsentative Standardkurve des iNOS ELISAs

Jeder Probe kann also eine optische Dichte und eine iNOS- Konzentration zugeordnet werden. Wie aus Abbildung 5 hervorgeht hat auch die Negativkontrolle (der Punkt auf der Ordinate) eine minimale optische Dichte. Diese optische Dichte des Leerwertes wurde von jeder optischen Dichte subtrahiert. Nach Bildung von Mittelwerten der Doppelwerte, konnten Quotienten der optischen Dichte gebildet werden.

Ein Wert von 0,5 drückt aus, dass die iNOS-Expression des Polypen unter Cineol-Behandlung sich halbierte.

#### 4.11.3 Kalorimetrische NO-Messung

##### 4.11.3.1 Hintergrund

Stickstoffmonoxid ist ein kurzlebiges Molekül welches im Körper spontan zu Nitrat oxidiert wird, sodass es eine direkte NO-Messung schwerfällt. Nitrat kann durch Nitratreduktasen in Nitrit umgewandelt werden. Nitrit ist biochemisch leicht zu bestimmen und entspricht der vom Gewebe produzierten NO-Menge und gilt daher als indirektes Maß zur NO-bestimmung in diesem experimentellen Ansatz.

##### 4.11.3.2 Durchführung

Die Proben wurden nach der Inkubation mit Medium oder mit 100  $\mu$ M Cineollösung in Medium in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die NO-Bestimmung wurden 20 mg des Gewebes in eiskalten *phosphat buffered saline* (PBS) gewaschen und in vom Hersteller mitgelieferten Puffer (300  $\mu$ l) aufgenommen. Daraufhin wurden die Gewebstückchen mit einem Pistill homogenisiert und bei 14.000g 5 Minuten lang zentrifugiert. Es wurde eine Bradford-Bestimmung des Überstandes durchgeführt. Es folgte nun der Schritt der

Deproteinierung, da Proteine die NO-Bestimmung behindern können. Diese wurde mit Säulen vollzogen, welche als Sieb für Proteine fungieren, die 10 kDa und größer sind. Dazu wurde der Überstand 25 min bei 14.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss stand dann für die NO-Messung zur Verfügung.

In jede Mikrotiterplatte sollten laut Herstellerangaben zwischen 1 bis 85 µL der vorbereiteten Probe gegeben werden. Bei den Versuchen dieser Arbeit wurden 30 µL genutzt. Hinzu kamen jeweils 5 µL eines Kofaktors und der Nitratreduktase. Tabelle 9 skizziert den Ablauf des Arrays.

**Tabelle 11: Ablauf der kalorimetrischen NO-Messung**

<b>Prozedur: Hinzugeben von...</b>	<b>Menge (µL)</b>	<b>Dauer/Inkubation</b>
Proben+Nitratreduktase+Kofaktor	30+5+5	1 h
<i>Enhancer</i> (Reaktionsbeschleuniger)	5	10 min
Griess-Reagenz A	50	0 min
Griess-Reagenz B	50	∞

Die Zugabe der Griess-Reagenzien führt zu der Bildung eines fluoreszierenden Farbstoffs, dessen Menge der Nitratmenge des Gewebes entspricht und dessen optische Dichte (OD) bei 540nm gemessen werden kann. Nach Herstellerangaben wurden eine Standardkurve und Leerwerte mit Doppelwerte erstellt. Die Leerwerte wurden entsprechen jeder Probe substrahiert. Auch die Nitratkonzentrationen der Gewebe wurden mit Doppelwerten erstellt. Mit folgender Formel ließ sich die Nitratkonzentration nach Herstellerangaben berechnen:

**Formel 6: Ermittlung der Nitritkonzentration in nmol/L**

$$\text{Nitritkonzentration} = \frac{OD(\text{Probe}) - OD(\text{Leerwert})}{\text{Steigung der Standardkurve}} / \text{Probenvolumen}$$

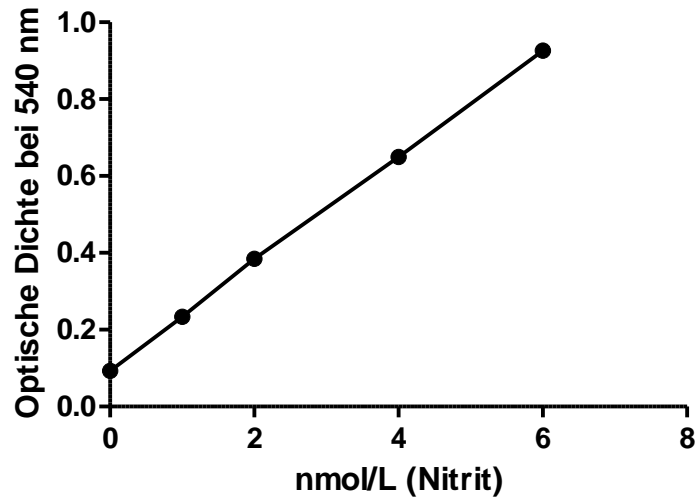


Abbildung 6: Standardkurve der kalorimetrischen NO-Messung

Die Nitritkonzentration musste noch normalisiert werden, indem sie durch die Proteinkonzentration dividiert wurde. Es folgte erneut die Bildung des Quotienten des Cineol-behandelten Polyys zu seiner Mediumkontrolle.

#### 4.11.4 Phosphokinase-Protein-Array

Der *Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Antibody Array* ermöglicht es gleichzeitig die Phosphorylierungslevel von 46 Kinasen an spezifischen Phosphorylierungsstellen zu bestimmen. Die Antikörper für die bestimmten Proteine und die Kontrollen befinden sich bereits auf einer Nitrocellulosemembran. Dieses Verfahren ähnelt dem Western-Blotting-Verfahren, nur dass sich zunächst die Primärantikörper auf der Membran befinden und nicht die denaturierten Proteine. 20-40 mg Gewebe wurden wie bereits beschrieben nach PBS-Waschung zerkleinert und in einem vom Hersteller mitgelieferten Lysispuffer aufgenommen. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C wurde für 5 Minuten bei 14.000g zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt und die oben erwähnte Proteinbestimmung durchgeführt.

Die homogenisierten Proteinlysate (250 µg pro Array) wurden gemäß Herstellerangaben auf die Nitrocellulosemembran gebracht. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem zehnmütigem Waschen mit TBS-T-0,1% wurde mit biotinylierten Sekundärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, woraufhin jener nach erneutem Waschen mit einer Meerrettich-Peroxidase für 30 Minuten gekoppelt wurde. Es folgte eine erneute Waschung. Nachdem die Membranen mit zwei Chemilumineszenz-Reagenzien für eine Minute inkubiert wurden, konnte das Signal detektiert werden, wobei

jedes Signal einer bestimmten Phosphorylierungsstelle eines Proteins entsprach. Die Quantifizierung des detektierten Signales erfolgte mit dem Programm *Image J*. Die Normalisierung wurde auf die vom Hersteller angegebene Positivkontrolle durchgeführt.

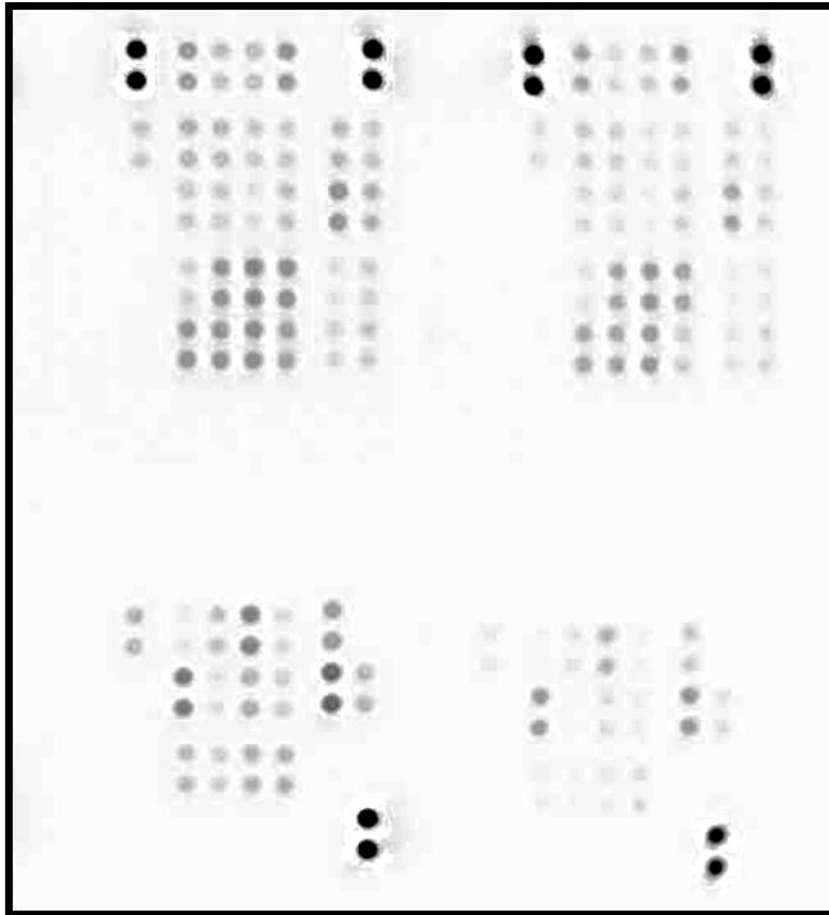


Abbildung 7: Beispiel eines entwickelten Phosphokinasearrays

#### 4.11.5 Histologie

##### 4.11.5.1 *Anfertigung von Kryoschnitten*

Das bei 80°C weggefrorene Gewebe wurde mittels Cryomatrix auf die Metallplatte des Kryostat CM 3050S (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) befestigt und Schnitte von 6-8 µm Dicke hergestellt. Die optimale Dicke wurde mittels Anfärben durch Methylenblau bestätigt. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht und eine Stunde an der Luft bei Zimmertemperatur getrocknet; anschließend wurden sie bei -80 °C weggefroren.

##### 4.11.5.2 *Indirekte Immunfluoreszenz*

Die indirekte Immunfluoreszenz beruht auf der Primärantikörperbindung mit dem darzustellenden Antigen. An den Primärantikörper bindet der Sekundärantikörper, welcher

mit einem Fluorochrom gekoppelt ist. Jeder Primärantikörper kann mehrere Sekundärantikörper binden, was eine Signalverstärkung nach sich zieht. Durch die Fluoreszenzmikroskopie, die darauf beruht, dass nur all jene Wellenlängen des Lichts durch einen so genannten Anregungsfilter gelangen, welche nicht der Wellenlänge des Fluorochroms entsprechen, kann das Antigen sichtbar gemacht werden.

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Kryoschnitte wurden für 10 Minuten an der Luft getrocknet, anschließend fixiert und permeabilisiert. Dafür wurden die Schnitte 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd (PFA) /0,1% TritonX100 inkubiert. PFA fixiert, TritonX100 permeabilisiert das Gewebe. Darauffolgend wurden die Schnitte mit dem PAP-Pen Liquid Blocker umkreist und dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert, wobei reiner Antikörperverdünnungspuffer als Negativkontrolle diente. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS erfolgte die Inkubation mittels Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Diamidin-phenyllindol (DAPI)-Zellkernfärbung zur Orientierung folgte nach erneutem Waschen für 5 Minuten. Erneutes Waschen ging der Eindeckung mit Faramount voraus.

#### **4.11.5.3 Mikroskopie**

Ausgewertet wurden die mikroskopischen Präparate mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss AG, Oberkochen). Belichtungszeit und Lichtstärke wurden für die jeweilige Vergrößerung (100-fach, 200-fach, 400fach) weitestgehend gleich gehalten. Die Beurteilung der Färbintensität erfolgte durch subjektive Einschätzung. Ein Vergleich mit einer entsprechenden Kontrolle wurde stets durchgeführt und falsch-positive Signale auszuschließen.

#### **4.12 Statistik**

Für die statistische Analyse und die dargestellten Graphen wurde die Software Graph Pad Prism (Graph Pad, San Diego) genutzt. Lageparameter und Abweichungsparameter wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für gepaarte Stichproben und dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. p-Werte kleiner oder gleich 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

## **5 Ergebnisse**

Die CRSwNP ist eine Erkrankung mit unbekannter Ätiologie. Da Stickstoffmonoxid bekanntermaßen modulierende Eigenschaften auf die oberen Luftwege hat, wird in dieser Arbeit die Expression von eNOS in CRSwNP analysiert. Da in Vorarbeiten eine verstärkte Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 in CRSwNP nachgewiesen wurde, soll nun untersucht werden, ob durch Cineol, dem antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden, die Expression und Regulation von eNOS und STAT3 in CRSwNP beeinflusst werden kann.

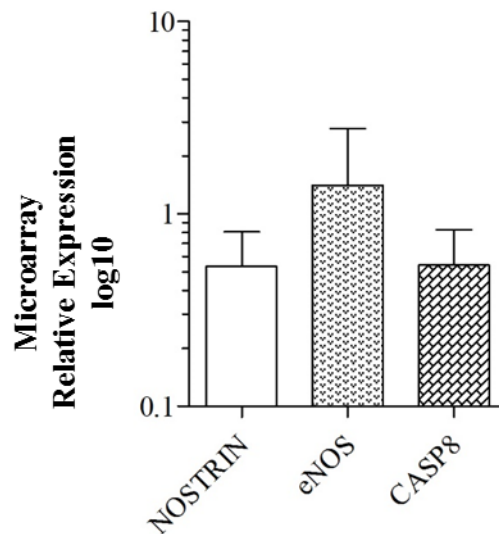
Um einen Überblick zu erhalten, wurden zunächst bereits vorhandene Microarray-Daten von acht Patienten ausgewertet, bei denen Proben aus Polypen und gesunder unterer Nasenmuschel analysiert werden konnten. Anschließend wurden auf RNS- und Proteinebene sowie mittels Immunhistochemie die Expression von eNOS und STAT3 mit und ohne Einflussnahme von Cineol betrachtet.

Zunächst werden die Ergebnisse dargestellt, die den Vergleich zwischen Polyp und Nasenmuschel untersuchen; im Anschluss daran werden jene Ergebnisse präsentiert, die untersuchen, ob Cineol einen Einfluss auf das Expressionsprofil von eNOS und STAT3 in nasalen Polypen hat.

### **5.1 Expression von eNOS, Nostrin und Caspase8 in CRSwNP**

Um die grundlegende Expression von eNOS, Nostrin und Caspase-8 im Gewebe von Polyposis-nasi-Patienten zu ermitteln, wurde nativ gefrorenes Gewebe wie in Abschnitt 4.9 beschrieben verarbeitet und anschließend analysiert, wobei für Nostrin und Caspase-8 lediglich die Microarray-Analyse durchgeführt wurde.

### 5.1.1 Microarray



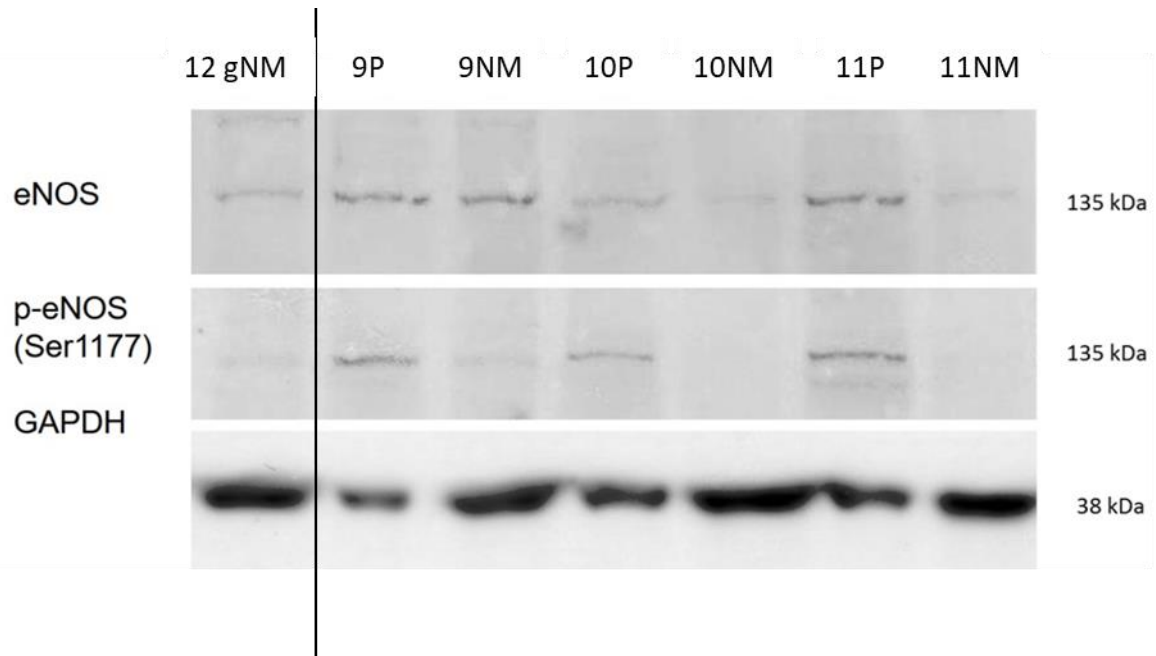
**Abbildung 8: Relative Expression von NOSTRIN, eNOS und CASPASE-8 in der Microarray-Analyse**

Es wurde für jedes Gen 8 Pärchen analysiert. Ein Pärchen bestand aus Gewebe von einem nasalen Polypen und dem korrespondierenden Gewebe der unteren Nasenmuschel des jeweils gleichen Patienten (Patienten 1-8). Ein Wert von 1 in der Abbildung bedeutet, dass keine Änderung in der RNS-Expression stattfand. Für Nostrin ergab sich ein Mittelwert von 0,53, für eNOS ein Wert von 1,42 und für Caspase-8 ein Wert von 0,44. Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung an.

Nostrin (0,53-fach) und Caspase-8 (0,44-fach) sind auf RNS-Ebene in der Microarray-Analyse im Polypengewebe im Vergleich zur korrespondierenden Nasenmuschel herunterreguliert. Für eNOS zeigt sich eine Erhöhung der Expression (1,42-fach) (Abbildung 8).

### 5.1.1 Western-Blot-Analyse

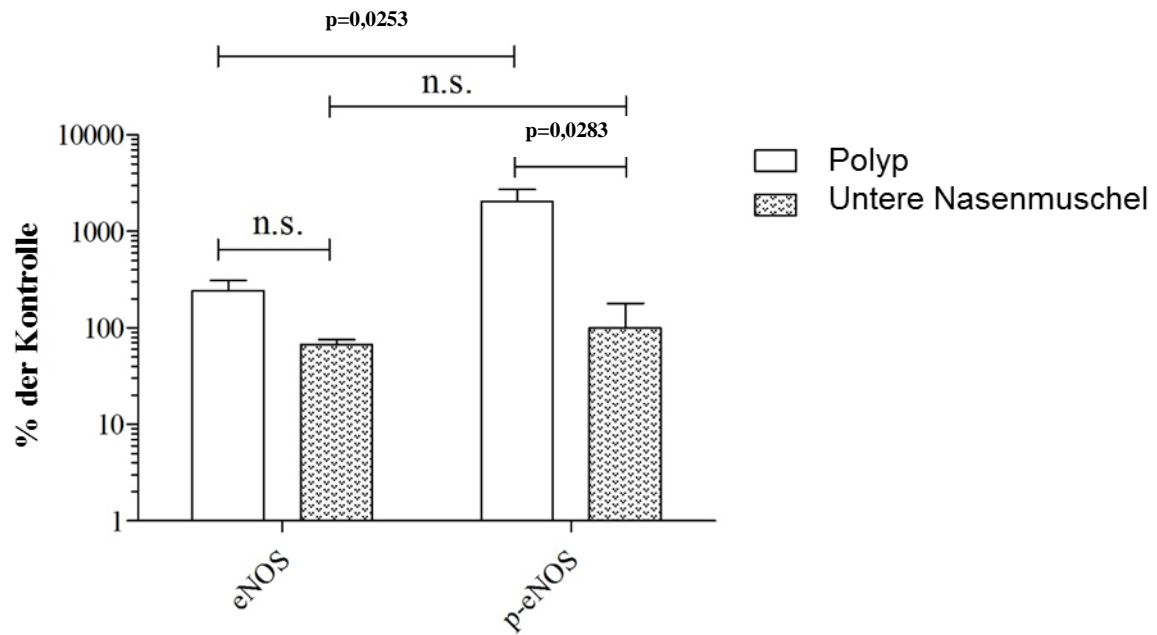
Folgend wurden Untersuchungen zur Charakterisierung von eNOS auf Proteinebene in CRSwNP durchgeführt, um die ermittelten Ergebnisse der Microarray-Analysen zu untermauern



**Abbildung 9: Expressionsprofile von drei nasalen Polypen bezüglich eNOS, p-eNOS und GAPDH**

Es sind die Ergebnisse von drei Westerblot Analysen aufgezeigt. In zwei von drei der hier gezeigten nasalen Polypen (P) scheint die eNOS-Expression im Vergleich zur korrespondierenden Nasenmuschel (NM) erhöht. Bei allen drei Polypen ist die Phosphorylierung von eNOS deutlich erhöht. In der ersten Spalte ist die Expression einer gesunden Nasenmuschel (gNM) aufgeführt. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH verwendet. Es wurden neben den oben genannten Patienten (9, 10, 11, 12) die Ergebnisse der Patientin 13, 14, 15, 16 und 17 in das Experiment einbezogen.

Insgesamt wurden die Gewebeproben von acht Patienten analysiert; drei repräsentative Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Die statistische Auswertung ergab eine deutliche 2,3fache-Expressionserhöhung von eNOS, jedoch wurde keine Signifikanz erreicht (Abbildung 10). Als Basisexpression von eNOS in nasaler Mukosa kann die Expression von eNOS in der gesunden Nasenmuschel (gNM) angenommen werden. Durch Phosphorylierung an Serin-1177 wird eNOS aktiviert (p-eNOS-1177). Die Expression von dieser phosphorylierten eNOS-Form in Polypengewebe ist stark signifikant erhöht (19,7fach,  $p=0,0253$ ). Darüber hinaus konnte signifikant mehr p-eNOS-1177 als unphosphoryliertes Protein nachgewiesen werden ( $p=0,0283$ ); dies war in den unteren Nasenmuscheln nicht der Fall (vgl. Abb.10).

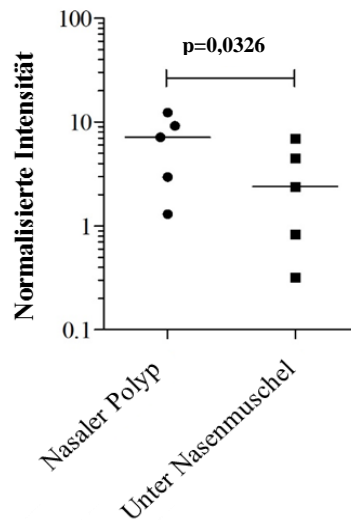


**Abbildung 10: Statistische Ergebnisse der WB-Analyse im Vergleich zur gesunden unteren Nasenmuschel, (n.s.: nicht signifikant)**

In dieser Abbildung sind die Ergebnisse der 8 Western-Blot-Analysen (n=8) graphisch dargestellt. Die Grundexpression von eNOS wurde anhand der gesunden Nasenmuschel ermittelt und entspricht hier einer Expression von 1. Die Balken geben die prozentuale Erhöhung der Gewebe gegenüber der gesunden Nasenmuschel an. Die eNOS Expression erhöht sich im Mittel um 2,3 (linke Balken); p-eNOS erhöht sich im Polypen im Mittel um 19,7. In Polypen ist die Menge des phosphorylierten Proteins im Vergleich zum unphosphorylierten signifikant erhöht (rechte Balken). Darüber hinaus lässt sich eine signifikante Erhöhung der p-eNOS-Werte in Polypen im Vergleich zur korrespondierenden Nasenmuschel beobachten (helle Balken). Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aufgeführt. Statistischer Test: Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für gepaarte Stichproben,

### 5.1.2 Phosphokinasearray-Analyse

Auch die fünf Phosphokinasearrays, die zur Kontrolle des Ergebnisses durchgeführt wurden, zeigten eine signifikante Erhöhung der p-eNOS-1177-Werte im Vergleich zur korrespondierenden Nasenmuschel. Es konnten hier dreifach erhöhte Werte festgestellt werden (Abbildung 11).

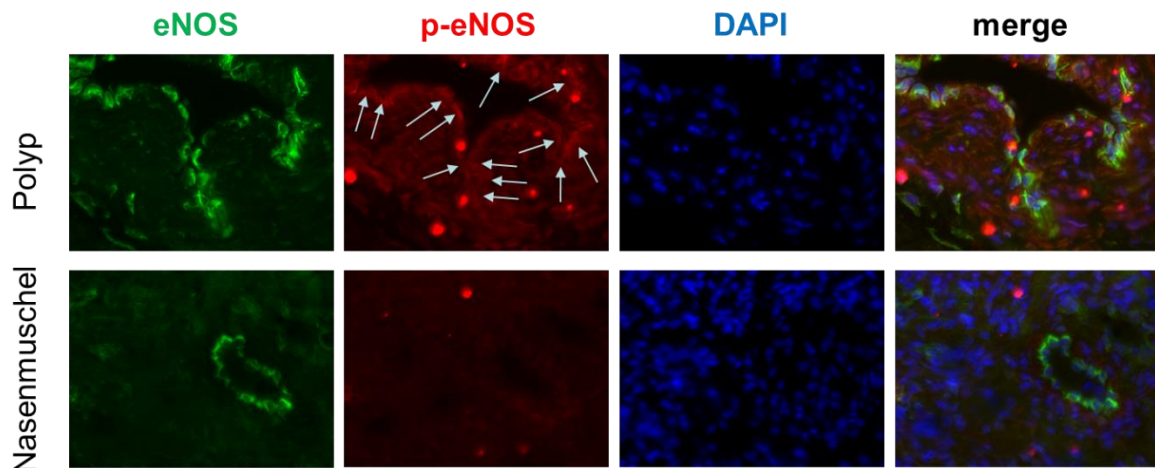


**Abbildung 11: Phosphokinasearray: Phosphorylierungsgrad von eNOS in nasalen Polypen und unterer Nasenmuschel**

Jeder Datenpunkt entspricht einem Patienten (n=5), wobei zu jeder unteren Nasenmuschel ein nasaler Polyp gehört. Dargestellt ist der Median. Man erkennt eine deutliche Erhöhung des p-eNOS(1177)-Wertes mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  ( $p=0,0326$ ). Die Gewebe der Patientin 9, 10, 11, 13 und 14 gingen in dieses Experiment ein. Normalisiert wurde im Phosphokinasearray auf der *housekeeping*-Gen GAPDH. Statistischer Test: Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für gepaarte Stichproben

### 5.1.3 Immunfluoreszenz-Analyse

Abschließend soll eine Immunfluoreszenz an kryokonservierten Gewebeschnitten von Polypen und Nasenmuscheln die Veränderungen verdeutlichen.



**Abbildung 12: Immunfluoreszenz: Darstellung von eNOS, p-eNOS und DAPI als Kernfärbung**

Es ist eine deutliche Expression von eNOS (grün) und p-eNOS-1177 (rot) in nasalen Polypen zu erkennen. Die Gewebe der Patientin 9, 10, 11, 13 und 14 gingen in dieses Experiment ein. Die weißen Pfeile deuten auf die starke Expression von p-eNOS, welche im darunterliegenden Bild in der Nasenmuschel fehlt. Die stark leuchtenden roten Punkten stellen unspezifische Färbefehler dar. In der unteren Nasenmuschel fällt die

Anfärbarkeit von eNOS und p-eNOS-1177 weniger stark aus und übertrifft kaum das Hintergrundsignal. Die Vergrößerung beträgt 100 (n=5).

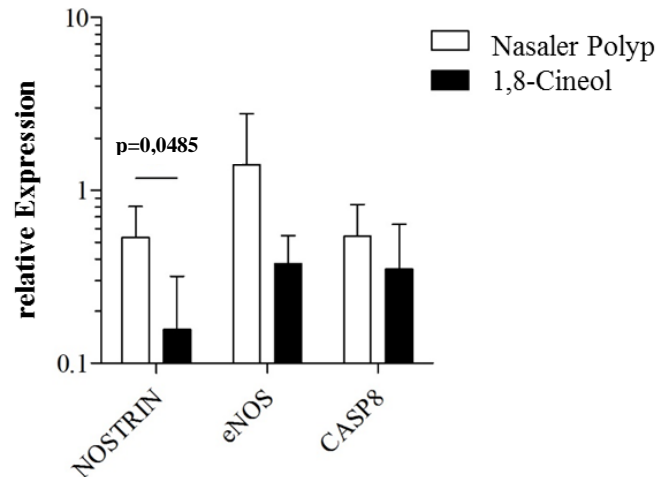
Im nasalen Polypen ist eine deutliche Expression von eNOS zu erkennen. Besonders in epithelialen Zellen stellt sich eine intensive Grünfärbung dar. An korrespondierender Stelle (Pfeile) erkennt man auch eine deutliche Rotfärbung, also eine erhöhte p-eNOS-1177-Konzentration. Diese Ergebnisse korrelieren hervorragend mit den Western-Blot-Analysen. In der unteren Nasenmuschel erkennt man vor allem in der innersten Schicht eines Gefäßes, also endothelial, eine verstärkte eNOS-Expression, verstärkt aktiviert sind diese eNOS-Moleküle jedoch nicht, was durch das Fehlen der intensiveren Rotfärbung in diesem Bereich erkannt wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im nasalen Polypen ganz im Gegensatz zur unteren Nasenmuschel eine eNOS-Aktivierung in epithelialen Zellen vorliegt.

## **5.2 Expression von eNOS, STAT3, Nostrin und Caspase-8 unter Inkubation mit Cineol**

NO und STAT haben bei Überexpression, wie einleitend dargestellt, potentiell proentzündlichen und vor allem STAT3 prokanzerogenen Charakter. Folgende Ergebnisse stellen dar, ob Cineol einen Einfluss auf die Expression und Regulation von eNOS und STAT3 hat. Hier sei kurz die Kulturmethode in Erinnerung gerufen. Das native Gewebe wurde nach operativer Explantation auf Eis gelegt und schnellstmöglich entweder mit *Dulbecca/Vogt modified Eagles's minimal essential medium* (DMEM) oder 0,01%- Cineol in DMEM für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Material mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und der Protein- oder RNS- Extraktion zugeführt.

### **5.2.1 eNOS-Signaling- Array**

Als ein einleitendes Experiment wurde eine Expressionsanalyse von eNOS-regulierenden Genen und dem Gen selbst auf RNS-Ebene unter einer Behandlung von 0,01% (0,6 mM) Cineol für 24 Stunden durchgeführt. Korrespondierend zu den Versuchen ohne Einflussnahme von Cineol wurde besonders auf die bereits untersuchten Gene NOSTRIN, eNOS und CASPASE-8 geachtet.



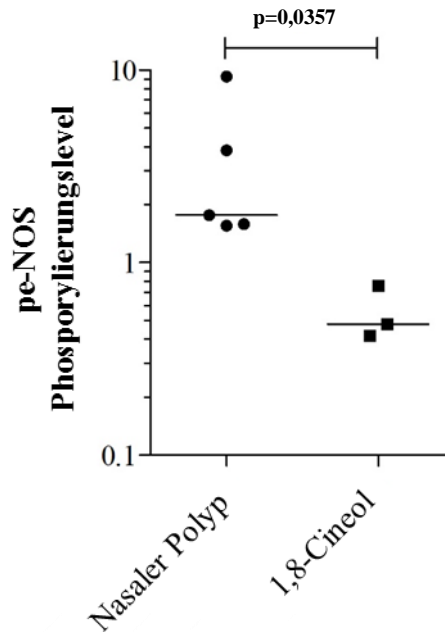
**Abbildung 13: Relative Expression der Gene von NOSTRIN, eNOS und Caspase-8 unter Cineolbehandlung**

Es wurden drei Polypen betrachtet (n=3), wobei ein Teil des Polypen wie beschrieben in Cineol inkubiert wurde. Die Proben der Patienten 22, 23 und 24 werden in diesem Experiment betrachtet. Eine signifikante Senkung des mRNA-Niveaus von NOSTRIN ( $p < 0,05$ ) ist erkennbar, auch die Expression der mRNA von eNOS und CASPASE-8 sinkt, jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Statistischer Test: Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für gepaarte Stichproben.

Die Expression aller drei Gene sinkt unter Cineol-Behandlung, jedoch erreicht nur NOSTRIN in diesem Falle Signifikanzniveau (Abbildung 13).

### 5.2.2 Phosphokinasearray-Analyse

Es folgte eine Betrachtung des Phosphorylierungsstatus von eNOS nach Cineolbehandlung. Im Phosphokinasearray zeigte sich orientierend bei drei mit Cineol behandelten Polypen eine signifikante Reduzierung der Phosphorylierung an der aktivierenden Serinstelle 1177 ( $p = 0,05$ ) (Abbildung 18).



**Abbildung 14: Phosphokinasearray: Darstellung der Phosphorylierung von eNOS unter Cineolbehandlung**

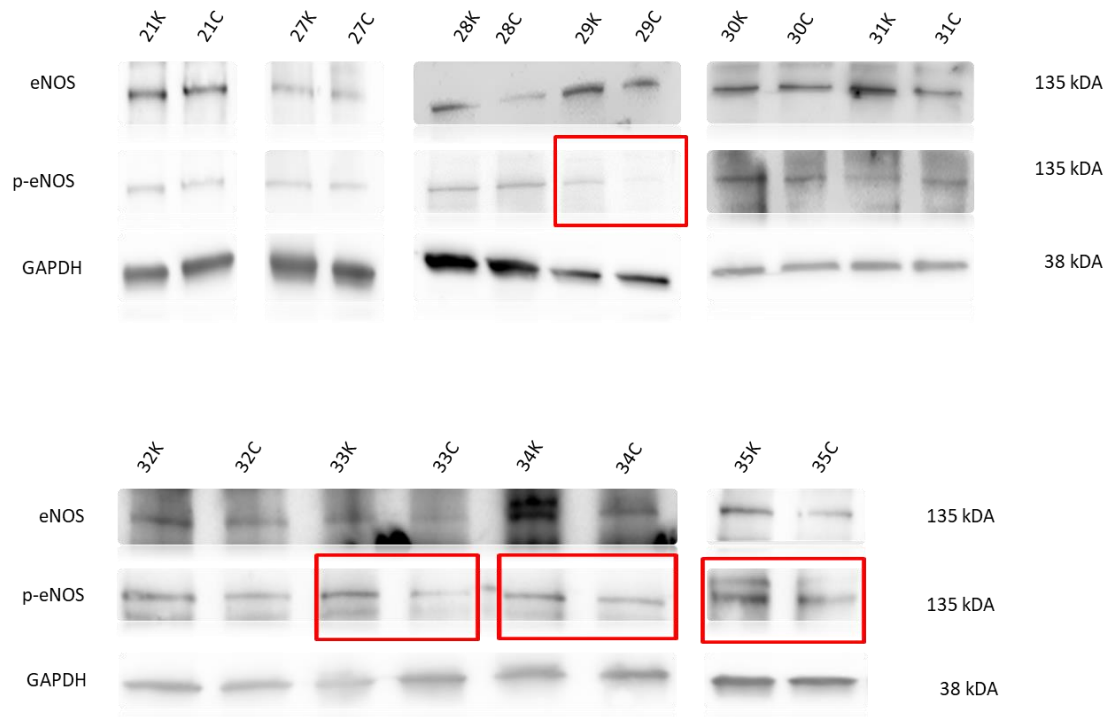
Es wurden fünf Polypen (18, 19, 20, 22, 24) untersucht, wobei es sich um drei Pärchen handelte (20, 22, 24) und zwei unbehandelte Polypen (18, 19) dem Experiment zugeführt wurden, die keine Behandlung erfuhren. Man erkennt eine deutliche Erniedrigung der Phosphorylierung dreier Polypen (Median=1,77) unter dem Einfluss von 0.01% Cineol, die unbehandelten hingegen zeigen wie oben erwähnt eine deutliche Phosphorylierung an Serin-1177 (Median=0.48),  $p \leq 0,05$  ( $p=0,0357$ ). Statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test

### 5.2.3 Western-Blot-Analyse von eNOS

An 10 Polypen wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt und hier die Expression von eNOS und p-eNOS (1177) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 aufgezeigt und in Abbildung 16 analysiert. In Abbildung 15 wird jeweils ein Pärchen von unbehandeltem Polypengewebe (K) und 0,01%-Cineol-behandelten Polypengewebe (C) betrachtet. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH verwendet. Die roten Kästchen weisen auf besonders prägnante Erniedrigung der p-eNOS-Expression hin.

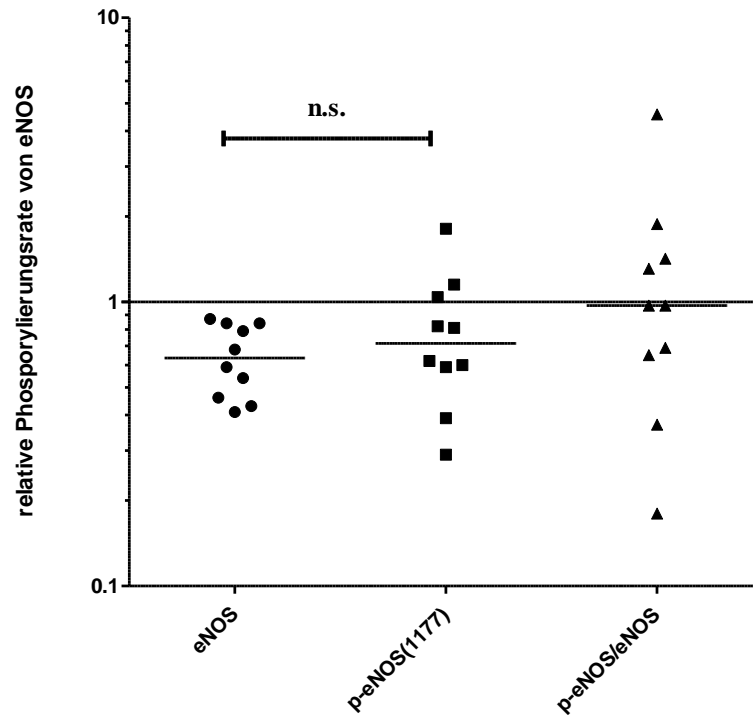
In der ersten Spalte von Abbildung 16 ist die eNOS- Erniedrigung unter Cineol zu sehen (Median=0,63). In der zweiten Spalte erkennt man deutlich, dass auch die Phosphorylierung bei 7 von 10 Polypen unter Cineolbehandlung rückläufig ist (Median=0,71). Die starke Streuung der Quotientenwerte in Spalte 3 erklärt sich durch die stärkere Streuung der p-eNOS-Werte. Ein Median um 1 kommt dadurch zustande, dass die Gesamtexpression von eNOS unter Cineol sinkt (vgl. Abbildungen 15 und 16).

Die im Phosphokinasearray ermittelten Werte konnten somit in der Western- Blot-Analyse bestätigt werden.



**Abbildung 15: Proteinexpression von eNOS und p-eNOS in nasalen Polypen unter Cineolbehandlung**

10 Polypen wurden untersucht (n=10). Es sind jeweils Pärchen dargestellt, von dem ein Teil mit Cineol behandelt wurde (C) und der andere nicht, also als Kontrolle diente (K). Bei allem Polypen ist eine eNOS-Gesamtprotein-Erniedrigung zu erkennen. Auch die Phosphorylierungsrate sinkt bei 7 von 10 Polypen. Besonders deutlich ist diese bei den Polypen der Patienten 29, 33, 34 und 35 zu erkennen (rote Kästen).

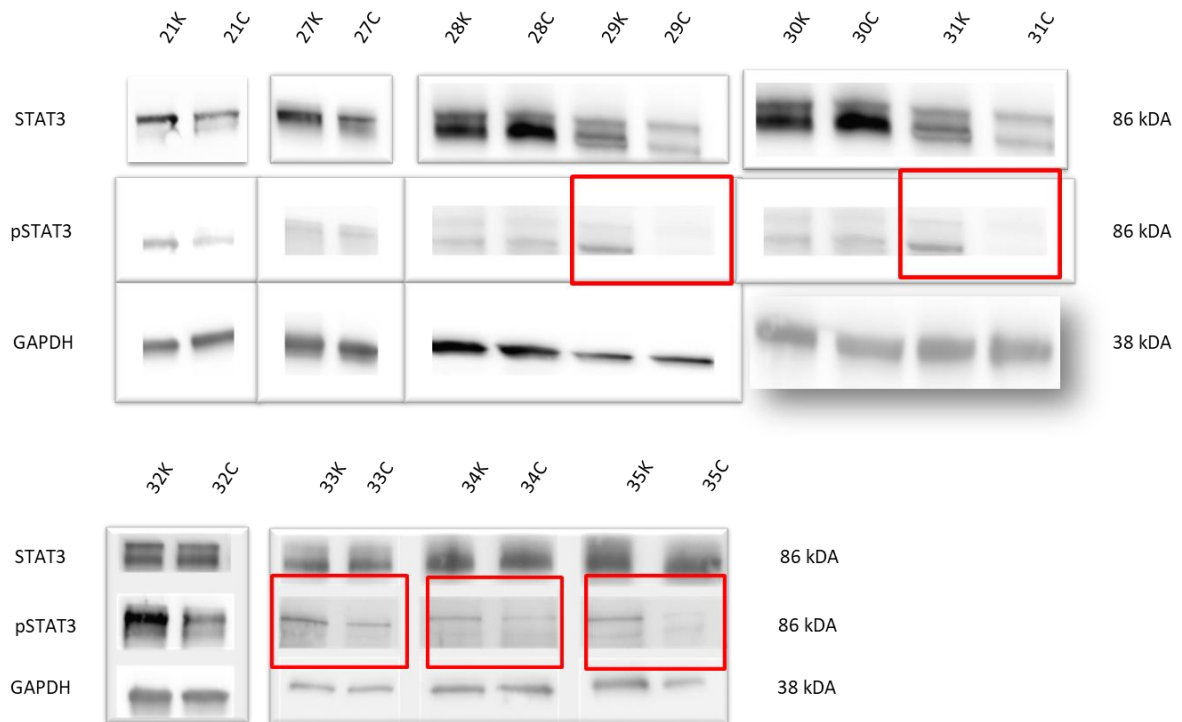


**Abbildung 16: Darstellung der Expression von eNOS, p-eNOS und ihres Quotienten unter Cineolbehandlung**

Die Proteinexpression von eNOS der zehn Polypen (n=10) unter Cineolbehandlung ist hier graphisch dargestellt. Als Zentralwert wurde der Median gewählt. Ein Wert von 1 bedeutet keine Änderung der Expression unter Cineolbehandlung. Man erkennt die bereits beschriebene Erniedrigung der eNOS Expression (Median=0,63) und eine Erniedrigung der Phosphorylierung an Serin-1177 (Median=0,71). Statistischer Test: Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für gepaarte Stichproben,  $p=0,375$

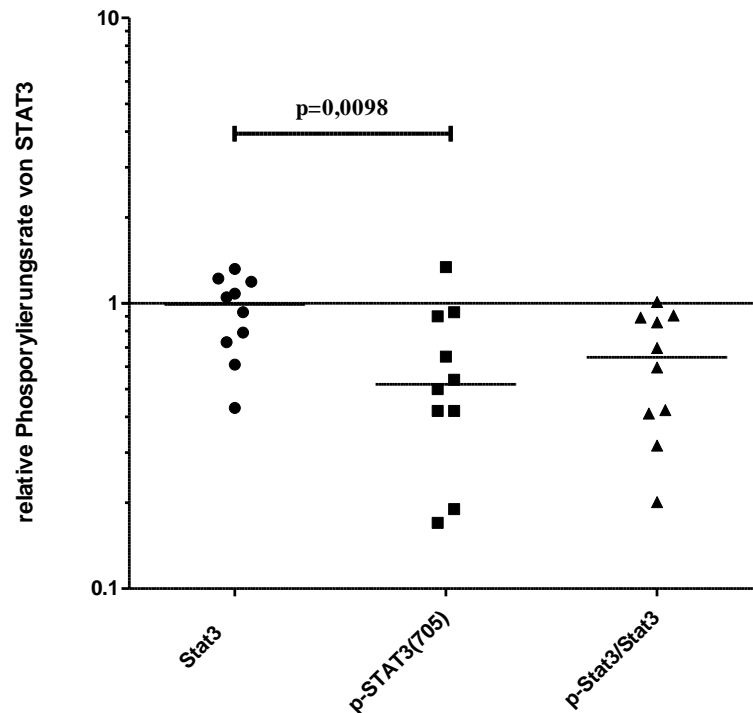
#### 5.2.4 Western-Blot-Analyse von STAT3

Im Folgenden soll die Proteinexpression des Transkriptionsfaktor STAT3 und seine aktivierende Phosphorylierungsstelle Tyrosin-705 betrachtet werden. Es wurden für dieses Experiment die gleichen Polypen wie für die zuvor gezeigte Western-Blot-Analyse benutzt.



**Abbildung 17: Expressionsprofile von STAT3 und p-STAT3 in nasalen Polypen unter Cineolbehandlung**

Es wurden die gleichen 10 Abbildungen wie in der Western-Blot-Analyse der eNOS-Expression untersucht. (n=10). Es sind jeweils Pärchen dargestellt, von dem ein Teil mit Cineol behandelt wurde (C) und der andere nicht, also als Kontrolle diente (K). Bei 5 von 10 Polypen ist eine Erniedrigung der Gesamtexpression von STAT3 zu erkennen. Bei 9 von 10 Polypen sinkt darüber hinaus die Phosphorylierungsrate. Besonders deutlich ist die bei den Polypen zu erkennen, die mit einem roten Kästchen gekennzeichnet sind.



**Abbildung 18: Darstellung der Expression von STAT 3, p-STAT 3 und ihres Quotienten unter Cineolbehandlung**

Man erkennt in der zweiten Spalte eine deutliche, sehr signifikante Erniedrigung der phosphorylierten Form von STAT3 (Median=0,52). Die Gesamtexpression des Proteins, welche in der ersten Spalte aufgetragen ist, ändert sich im Median nicht (Median=0,98). Auch der Quotient, also der Anteil der phosphorylierten Form an der STAT3-Gesamtheit sinkt bei 9 von 10 Polypen deutlich (Median=0,65), da sich die Gesamtmenge nicht ändert. Die horizontalen Linien geben den Median an. Statistischer Test: Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für gepaarte Stichproben,  $p=0,0098$

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse von STAT3 unter Cineol-Behandlung. Wie zuvor bei eNOS wurde hier direkt nebeneinander unbehandeltes und Cineol-behandeltes Polypengewebe direkt nebeneinander untersucht. Die roten Kästchen weisen wiederum auf prägnante Ergebnisse in der pStat3-Expression hin.

Das Diagramm in Abbildung 18 zeigt, dass die Expression von STAT3 sich bei 5 von 10 Polypen erniedrigt, bei der anderen Hälfte steigt die Expression leicht (Median=0,97). Die Phosphorylierung an Tyrosin-705 nimmt bei 9 von 10 Polypen ab (Median=0,52). Es erfolgt also nahezu eine Halbierung der Phosphorylierungsrate. Betrachtet man den Quotienten, also den Anteil der phosphorylierten Form an der Gesamtheit des Transkriptionsfaktors, lässt sich bei keinem Polypen mehr eine gesteigerte Phosphorylierung erkennen (Median=0,65) (vgl. Abb. 17 und 18). Dieses Ergebnis ist sehr signifikant ( $p=0,0098$ ).

### 5.2.5 Western-Blot-Analyse von Caspase-8 und Nostrin

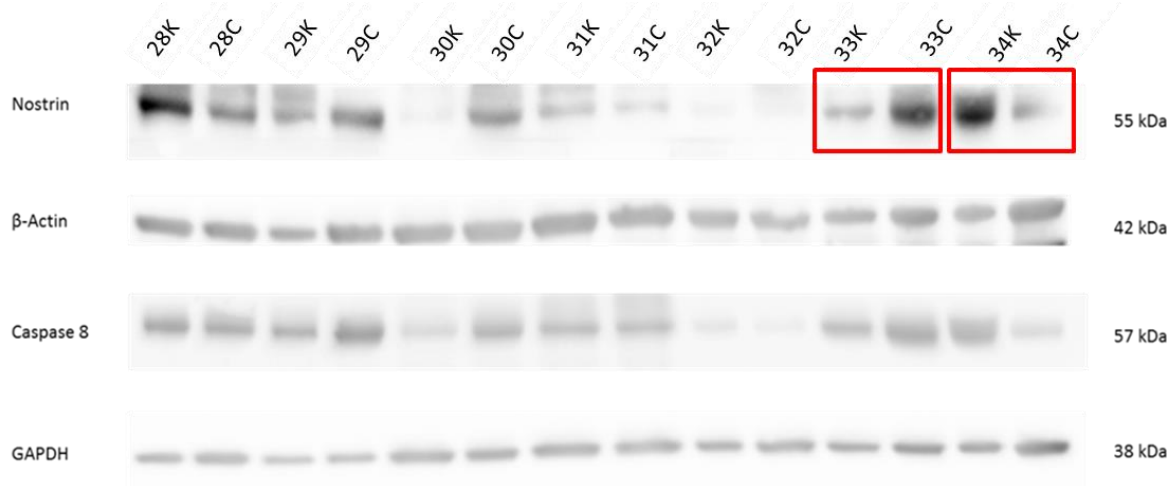


Abbildung 19: Western-Blotting-Analysen von nasalen Polypen unter Cineolbehandlung auf Caspase-8 und Nostrin (n=7)

In Zeile 1 ist die Proteinexpression von Nostrin aufgezeigt. Die roten Kästchen umranden zwei repräsentative Ergebnisse. In einem Fall erreicht Cineol eine deutliche Erhöhung der Nostrin Expression, im anderen Fall sinkt unter Cineol die Expression. Als Positivkontrolle wurde in diesem einzigen Fall auf  $\beta$ -Actin zurückgegriffen. Die dritte Zeile zeigt die Caspase-8 Expression. Hier wurde GAPDH als Ladungskontrolle gebraucht.

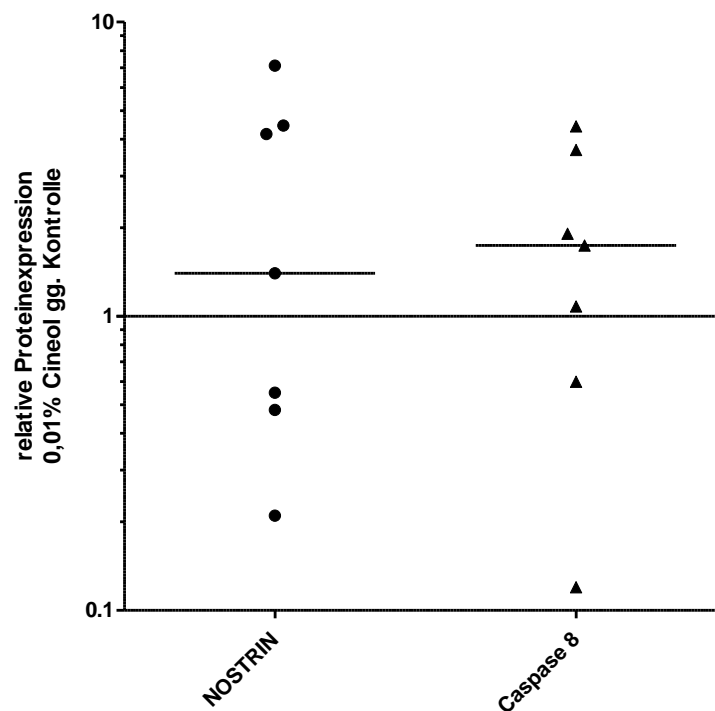


Abbildung 20: Auswertung der Nostrin und Caspase-8- Western-Blotting-Analysen

In der Gesamtschau der Ergebnisse kann eine leichte Erhöhung der Expression sowohl von Nostrin (Median=1,39), als auch von Caspase-8 (Median=1,74) erreicht werden, wobei die Ergebnisse stark in ihrer Ausprägung stark schwanken. 4 von 7 Polypen zeigen unter Cineol eine Erhöhung der Expression, drei

demgegenüber eine Erniedrigung. 5 von 7 Polypen zeigen eine Erhöhung der Caspase-8-Expression, bei 2 von 7 sinkt die Expression.

Abbildung 19 zeigt die Western-Blot-Analyse von sieben Polypen unter Cineolbehandlung. Die Beschriftung beginnt in dieser Abbildung mit Patient 3, um zu verdeutlichen, dass dieser der gleiche Polyp ist, welcher auch in der eNOS und Stat3-Western-Blot-Analyse mit 3 benannt ist.

Die Analyse in Abbildung 20 ergab eine starke Streuung der Expression von Nostrin und Caspase 8. 3 von 7 Werte zeigten eine Erniedrigung der Nostrinexpression unter Cineolbehandlung, 4 zeigen eine Erhöhung (Median=1,39). Caspase 8 zeigte nur in 2 von 7 Polypen eine verminderte Expression (Median=1,74), die anderen 5 Werte steigen unter Cineolbehandlung.

### **5.3 iNOS-Expression und NO-Produktion unter Inkubation mit Cineol**

Die NO-Produktion hängt in nasaler Mukosa nicht nur von der eNOS-Expression, sondern auch von der iNOS-Expression ab. Anhand von zwölf Polypen wurde mit einem ELISA die Expression dieser NOS-Form unter Einflussnahme von Cineol ermittelt. Hierzu wurde der Quotient aus dem mit Cineol behandelten Polypen und dem Kontrollpolypen in Medium gebildet, um die relative Expression von iNOS unter Cineolbehandlung zu erhalten. Es wurden jedes Mal die optischen Dichten zur Bestimmung der Quotienten herangezogen.

Gleichzeitig wurde die Nitrit-Menge, die als Anhalt für die Menge des produzierten NO gilt in vier Polypen ermittelt. Es scheint, als lasse sich die iNOS-Expression nicht durch die Behandlung mit Cineol einheitlich senken oder steigern. Interessanterweise ist bei einer iNOS-Erhöhung jedoch die NO-Produktion in nasalen Polypen auch erhöht und bei einer erniedrigten Expression erniedrigt. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 21 farblich hervorgehoben.

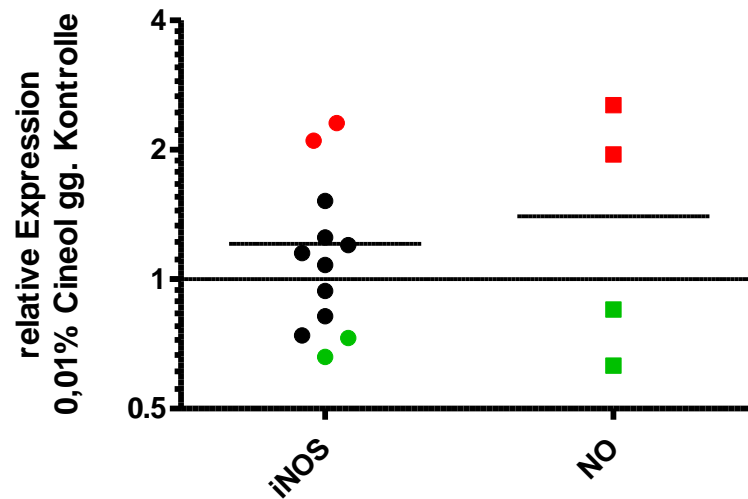


Abbildung 21: Ergebnisse des iNOS-ELISAs und der NO-release Assays

Unter Cineolbehandlung lässt sich keine einheitliche Expressionsänderung von iNOS erzielen. Sieben Polypen reagieren mit einer Expressionserhöhung (35,33,24,27,29,28,30), fünf mit einer Expressionerniedrigung (31,26,25,34,32). Allerdings führt eine iNOS-Erhöhung zu einer vermehrten NO-Produktion (rote Markierung 35 und 33), eine verminderte Expression führt zu einer verminderten Produktion (grüne Markierung 32 und 34). Jeder Datenpunkt entspricht einem Patienten. Die waagerechten Striche kennzeichnen die Mediane (1,21 für iNOS; 1,4 für die gemessene NO-Menge).

## 6 Diskussion

### 6.1 Erhöhte eNOS-Aktivierung in CRSwNP

Nachfolgend sollen mögliche Gründe für die erhöhten Phosphorylierungsraten von eNOS und STAT3 aufgezeigt werden, Mechanismen beschrieben werden, auf welchem Wege Cineol Einfluss auf ihren Metabolismus nimmt und etwaige Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen dargelegt werden.

Die Expression von eNOS in gesunder nasaler Mukosa ist gut erforscht. So beschreiben Furukawa *et al.* [32] eine Expression in epithelialen, endothelialen und glandulären Zellen des Gewebes. Knipping *et al.* können darüber hinaus eNOS im Zytoplasma kapillärer Zellen elektronenmikroskopisch nachweisen. In venösen Sinusoiden und Endothelzellen von venösen Gefäßen lässt sich demgegenüber kein eNOS nachweisen [58]. In adventitialen perivasalen Nervenfasern kann eine NO-Produktion und eNOS-Expression bestimmt werden [37, 52]. Hanazawa *et al.* vermuten den Ursprung dieser nitrinergen Fasern im Ganglion pterygopalatinum [37].

Zu der Expression von eNOS in CRSwNP ist weniger bekannt. Zwei kleine Studien von Sun *et al.* und Muluk *et al.* konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen der eNOS-Expression in gesunder Nasenmuschen und CRSwNP zeigen. Diese Studien nahmen gesunde Nasenmuschel als Kontrolle. Über die eNOS-Expression in nicht-polypösem Gewebe der unteren Nasenmuschel bei Patienten mit CRSwNP treffen sie keine Aussage. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen gesunder Nasenmuschel, CRSwNP und korrespondierender unterer Nasenmuschel gefunden werden. Auch die eNOS-mRNS der Microarray-Analyse war nur geringfügig erhöht (1,40fach).

Es gibt in der Literatur keine Aussagen zu der Phosphorylierung von eNOS an Serin-1177 (p-eNOS-1177) in nasalem Gewebe. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, dass zwar die Gesamtexpression des Proteins sich zwischen krankhaften polypösem Gewebe und korrespondierender Nasenmuschel nicht signifikant ändert, jedoch in polypösem Gewebe die Phosphorylierung und damit der Aktivierungsgrad von eNOS zunimmt. Die Konsequenzen dieser erhöhten Aktivierung und konsekutiver NO-Produktion lassen interessante pathophysiologische Erwägungen zu. So führt eine Dilatation der präkapillären Gefäße auf nitrinergen Stimulus zu einem erhöhten endokapillären Druck, was zu Extravasation von Plasma führt. Darüber hinaus postulieren Knipping *et al.* [58]

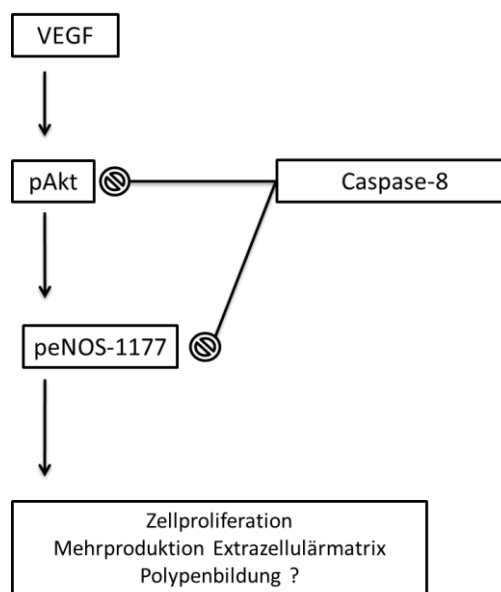
einen weiteren Effekt von NO auf kapilläre Perizyten, deren Relaxation eine Extravasation ebenfalls begünstigen würde. Die nitrinerge Innervation der Drüsen erhöht deren Aktivität; durch eine erhöhte periglanduläre Durchblutung durch oben beschriebene Vasodilatation werden Plasmaproteine zur Produktion glandulärer Produkte zur Verfügung gestellt, was in CRSwNP eine charakteristische Hypersekretion zur Folge hat, die klinisch als Rhinorrhoe manifest wird. Knipping *et al.* beschreiben eine erhöhte eNOS-Expression im Zytoplasma von perivaskulären Fibroblasten [58]. eNOS wird eine Beteiligung im Rahmen der Frakturheilung durch Osteoblastenaktivierung zugesprochen [123]. Es liegt nahe, dass auch eine Aktivierung der Fibroblasten durch NO in CRSwNP zu einer Proliferation dieser Zellen und einer damit verbundenen Mehrproduktion von Extrazellulärmatrix führen könnte.

Alle beschriebenen pathophysiologischen Mechanismen, von glandulärer Hypersekretion über Vasodilatation und Extravasation bis zu Fibroblastenaktivierung und damit einhergehender vermehrter Extrazellulärmatrix lassen sich gut mit der Pathohistologie und Pathophysiologie der CRSwNP in Einklang bringen. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass eine vermehrte p-eNOS-1177-Expression einen Anteil an der Pathogenese der CRSwNP trägt.

Über den Grund der verstärkten Phosphorylierung kann keine Aussage getroffen werden. Die Phosphorylierung von eNOS an Serin-1177 geschieht vornehmlich durch die Aktivität der Proteinkinase B, auch Akt genannt. Die Aktivierung dieser Kinase wiederum geschieht unter anderen durch die Kinase-Aktivität des *vascular-endothelial-growth-factor*-Rezeptors (VEGFR), welcher durch die Bindung seines Liganden VEGF aktiviert wird. Es ist bekannt, dass sowohl VEGF, als auch VEGFR in polypösem Gewebe von CRSwNP-Patienten vermehrt exprimiert werden [42, 61, 116]. So scheint es möglich, dass eine Überexpression des Wachstumsfaktors VEGF und seines Rezeptors in einer vermehrten aktivierenden Phosphorylierung von eNOS münden kann und einen Beitrag zur Pathogenese der CRSwNP leistet. Es ist erwähnenswert, dass nasale Polypen in der Regel am ostiomeatalen Komplex ihren Ursprung haben. In diesem Bereich kann es zu lokaler mukosaler Ischämie kommen, da hier Knochenvorsprünge, wie der Processus uncinatus und die mittlere Nasenmuschel, dicht aufeinander stehen. Bei Ischämie wird durch Fibroblasten *in vitro*, der *hypoxia induced factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) freigesetzt, welcher wiederum eine erhöhte Expression von VEGF nach sich zieht [13, 77, 105].

Na *et al.* konnten in ihrer Studie eindrucksvoll nachweisen, dass eine Behandlung mit VEGF von *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs), einer Standardzellreihe für die *in vitro* Erforschung von Endothelzellen, zu einer Aktivierung durch Phosphorylierung von Akt und eNOS führt, was sukzessiv eine erhöhte NO-Produktion nach sich zog.

Es ist erwähnenswert, dass Caspase-8 inhibierend auf diesen Signalweg wirkt [73]. Eine erniedrigte Caspase-8-Aktivität in CRSwNP (0,44-fach), wie sie in der Microarray-Analyse auffällt, könnte folglich ein kleiner Baustein für die Erklärung der erhöhten eNOS Phosphorylierung sein (Abbildung 12). Darüber hinaus ist die 0,55fache-Erniedrigung der NOSTRIN-mRNS-Menge plausibel. Eine Überexpression von Nostrin hat eine Translokation von eNOS vom Plasmalemma in das Zytoplasma zur Folge, was mit einer erniedrigten eNOS-Aktivität korreliert. Eine Erniedrigung der NOSTRIN-Transkription ist gut mit einer erhöhten eNOS-Aktivität in CRSwNP in Einklang zu bringen; es gibt jedoch keinerlei Berichte, ob Nostrin auf die Serin-1177-Phosphorylierung einen Einfluss hat.



**Abbildung 21: Schematische Darstellung der Wirkung von Caspase-8 auf die VEGF-eNOS-Achse: Caspase 8 ist in der Lage einen inhibierenden Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt und eNOS auszuüben. Verändert nach [73]**

In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass Caspase 8 in CRSwNP erniedrigt sein könnte. Eine verminderte Caspae-8- Aktivität würde nach Na *et al.* eine vermehrte Phosphorylierung begünstigen.

## 6.2 Erhöhte STAT3-Aktivierung in CRSwNP

Wichtige Vorarbeiten zu dieser Arbeit haben Linke *et al.* geleistet, die nachwiesen, dass in polypösem Gewebe von CRSwNP-Patienten eine konstitutive STAT3-Aktivierung durch Phosphorylierung an Tyrosin-705 vorliegt; eine Lokalisation von STAT3 im Zellkern liegt darüber hinaus vor, was ebenfalls für eine Aktivierung spricht [62]. Die Zielgene von

STAT3 haben anti-apoptotischen und proliferativen Charakter, als Beispiel seien Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-2 genannt [19]. Eine anti-apoptotische und proliferative Wirkung von STAT3 in malignen Neoplasien von HNSCC über nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom bis hin zum Glioblastoma multiforme ist hinreichend belegt [47]. Neu an Linkes *et al.* Ergebnissen war eine konstitutive STAT3-Aktivierung in einer benignen neoplastischen Erkrankung mit akzentuiertem inflammatorischen Charakter, der CRSwNP. So stellen die Autoren die Frage ob es Phytotherapeutika gibt, die in der Lage sind STAT3 in CRSwNP zu inhibieren, was zu einer Reduzierung von Proliferation und Anti-Apoptose führen könnte. Im Übrigen zeigten sowohl die Microarraydaten, als auch die Western-Blot-Analyse, keine Erhöhung der mRNA oder des Gesamtproteins [62].

Sowohl Xu *et al.* [119], wie einleitend erwähnt, als auch Ren *et al.* [83] scheinen mit Curcumin und Ginkgetin natürliche Inhibitoren des JAK/STAT3-Signalwegs gefunden zu haben. Xu *et al.* konnten an einer malignen Larynxkarzinom-Zelllinie zeigen, dass die Expression von pSTAT3, JAK2 und eNOS durch Inkubation mit 1µM und 10µM Curcumin konzentrationsabhängig signifikant sinkt. Ren *et al.* führten demgegenüber ihre Experimente an einer Zelllinie des Nierenzellkarzinoms durch. Sie behandelten die Zellen mit 4µM, 8µM und 16µM Ginkgetin. Auch diese Studie erkannte eine signifikant gesenkte Phosphorylierungsrate von STAT3 und darüber hinaus eine signifikante Steigerung der Apoptoserate, welche extrinsisch durch Caspase-8 und intrinsisch durch Caspase-9 vermittelt ist. Auch die Caspase der gemeinsamen Endstrecke, Caspase-3, zeigte unter der Behandlung mit Ginkgetin eine Expressionserhöhung. Die Verbindung aus Inhibierung der Proliferation, Anti-Apoptose durch STAT3-Hemmung und der Promotion der Apoptose durch Steigerung der Expression von Caspase-3,-8 und -9 scheint ein vielversprechender und wichtiger Einblick in die zukünftige Therapie neoplastischer Erkrankungen zu sein.

### **6.3 Die Rolle von Cineol auf die Phosphorylierung von eNOS und STAT3**

Diese Arbeit unternimmt als erste den Versuch an *ex-vivo*-Material von nasalen Polypen einen Einblick in den eNOS- und STAT3-Metabolismus nasaler Polypen unter Einflussnahme von 1,8-Cineol zu gewinnen und stellt die Frage, ob die nachgewiesene Enthemmung des eNOS- und STAT3-Metabolismus durch dieses Phytotherapeutikum beeinflusst werden kann. Dafür wurden nasale Polypen 24 h Stunden mit 0,01% Cineol beziehungsweise 0,6 mM Cineol in DMEM oder als Kontrolle mit DMEM behandelt. Die Zeit und Konzentration der Behandlung wurden aus dieser Arbeit vorausgehenden

Dimethylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Versuchen zum Zellüberleben ermittelt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Einflussnahme von Cineol in nasalen Polypen die Phosphorylierung sowohl von STAT3, als auch von eNOS behindert. So wurde in der orientierenden Phosphokinasearray-Analyse deutlich, dass Cineol signifikant in der Lage ist, die Phosphorylierung an Serin-1177 zu senken ( $p \leq 0,05$ ) (vgl. Abb.18). In der Verifizierung durch eine Western-Blot-Analyse war dieser Einfluss in 7 von 10 Polypen erkennbar (vgl. Abb.19).

Die Blockierung der Phosphorylierung an pSTAT3-Thy-705 ist in 9 von 10 Polypen nachweisbar. Es stellt sich die Frage, ob eine gemeinsame Kausalität für die Inhibierung der Phosphorylierung ausgemacht werden kann.

Beiden Signalkaskaden ist gemein, dass ihnen für die Signaltransduktion von extrazellulär nach intrazellulär eine Tyrosinkinase vorgeschaltet ist. Im Falle von eNOS kann dies über den VEGFR geschehen, der vor allem in Endothelzellen exprimiert ist. In Epithelzellen, in denen ebenfalls eNOS nachweisbar ist (vgl. Abb.12), spielt der *epithelial growth factor receptor* (EGFR) eine größere Rolle. Beide Rezeptoren dimerisieren und autophosphorylieren sich nach Ligandenbindung, wie einleitend beschrieben. Es folgt eine Akt-Phosphorylierung, die eine eNOS-Aktivierung nach sich zieht. Im Falle von STAT3 erfolgt die Phosphorylierung direkt von der Kinase-Domäne des EGF-Rezeptors, als Ligand kommt unter anderen IL-6 in Frage [82].

Hypothetisch kommen mehrere Wirkmechanismen für Cineol im Tyrosinkinase-Signalweg in Betracht. Erstens könnte Cineol mit den Liganden der Rezeptoren um die Ligandenbindungsstelle konkurrieren, also ein unspezifischer Tyrosinkinase-Antagonist sein; unspezifisch, weil es die Phosphorylierung von sowohl eNOS, als auch STAT3 inhibiert. Zweitens besteht die Möglichkeit, dass das Phytotherapeutikum die Dimerisierung und Autophosphorylierung der Tyrosinkinasen hemmt, dieser Wirkmechanismus würde eine Blockierung der Phosphorylierung der Substrate der Tyrosinkinasen nach sich ziehen. Drittens könnte Cineol im Falle von STAT3 die nukleäre Translokation von STAT3 inhibieren, da für die Translokation aber eine Phosphorylierung notwendig ist, kommt dieser Möglichkeit weniger Bedeutung zu.

Die Fähigkeit von Cineol als Rezeptor-Antagonist zu agieren und die Signaltransduktion an diesem frühen Zeitpunkt zu unterbrechen scheint unwahrscheinlich, da Cineol als lipophile Substanz [89] in der Lage ist, Zellmembranen ohne einen aktiven Transport zu überwinden, was eine intrazelluläre Wirkung wahrscheinlicher macht.

Für die zweite Möglichkeit, also die Inhibierung der Autophosphorylierung und eine Hemmung der Substratphosphorylierung gibt es interessante Studien, die an dieser Stelle eingehender diskutiert werden sollen. Es ist allerdings zu betonen, dass die Studien keine *ex-vivo*-Studien sind, sondern *in-vitro*-Studien an gut charakterisierten malignen Zellreihen zum JAK/STAT-Signalweg unter Einflussnahme von Phytotherapeutika darstellen. Jeon *et al.* [46] beschäftigten sich mit dem Einfluss von Gingketin auf Prostatakarzinom-Zellen. Diese Substanz ist vornehmlich in der Pflanzenart *Gingko biloba* zu finden und ist in der Lage konzentrations- und zeitabhängig eine Erniedrigung der p-STAT3-Werte zu bewirken. Allerdings sinkt ebenfalls die STAT3-Expression nach 24 Stunden leicht. Durch einen Tyrosinkinase-Assay konnten die Autoren belegen, dass Gingketin die Tyrosinkinaseaktivität der JAK2-Kinase senkt, was die verminderte STAT3-Aktivierung erklären kann. Die Kinaseaktivität des EGFR, welcher eine Rolle für die Phosphorylierung von eNOS spielt, kann demgegenüber aber nicht in dieser Zellreihe gehemmt werden. Über den VEGFR und p-eNOS trifft diese Studie keine Aussage. Des Weiteren können Jeon *et al.* eine durch Caspase-3 vermittelte Induktion der Apoptose beschreiben, was zu einer Proliferationsinhibition führt [46]. Die bereits erwähnte Studie von Ren *et al.* kann durch Behandlung von Nierenkarzinomzellen eine Erniedrigung der Expression von JAK2, pSTAT3 und STAT3 ermitteln [83]. So scheint Gingketin sowohl einen Einfluss auf die Expression und Aktivität von JAK2 zu haben, als auch die Phosphorylierung und Expression von STAT3 senken zu können. Darüber hinaus induziert es Apoptose durch Expressionserhöhung der Caspasen-3, -8 und -9. Das Phytotherapeutikum nimmt also an mehreren Stellen Einfluss auf den JAK/STAT3-Metabolismus. Literatur über die Einflussnahme von Gingketin auf den eNOS-Metabolismus war nicht zu finden.

Curcumin senkt in Larynxkarzinom-Zellen die Phosphorylierungsrate von STAT3, ist aber nicht in der Lage die Gesamtexpression des Proteins zu reduzieren. Vielmehr gelang dies bei VEGF, JAK2 und eNOS konzentrationsabhängig [119].

Der sekundäre Pflanzenstoff Ginkgolid C, der ebenso wie 1,8-Cineol zur chemischen Familie der Terpene gehört, vermochte wie Curcumin und Gingketin, eine Hemmung des

STAT3-Signalwegs auszulösen. Er senkte *in vitro* die Aktivität der JAK2, nicht jedoch von JAK1. Die IL-6 induzierte STAT3- Phosphorylierung nahm nach Behandlung mit Gingkolid C ebenfalls ab. Wiederum wurden die Versuche an einer malignen Zellreihe des multiplem Myeloms gemacht [3].

Es stellt sich die Frage, ob diese Ergebnisse an standardisierten malignen Zellreihen auf eine Arbeit mit *ex-vivo*-Material übertragen werden können, bei der die Neoplasie benigne ist und vorwiegend inflammatorischen Charakter hat. Diese Annahme ist sicherlich zu diskutieren, doch geben diese Arbeiten inspirierende Impulse, um über den JAK/STAT3- und eNOS-Metabolismus in CRSwNP nachzudenken. So scheinen die drei genannten sekundären Pflanzenstoffe einen inhibierenden Einfluss auf den JAK2/STAT3-Metabolismus und durch Apoptoseinduktion einen antiproliferativen Effekt zu haben. Eine unspezifische Tyrosinkinaseinhibition im Falle von Cineol scheint ein wichtiger Wirkungsmechanismus zu sein.

Der dritte hypothetische Wirkmechanismus von Cineol ist, dass es die Translokation von STAT3 in den Zellkern unterbindet. Dies scheint es primär durch die beschriebene Hemmung der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors zu erreichen. Es gibt jedoch Berichte, dass unphosphoryliertes STAT3 in den Zellkern transloziert. Ob in phosphoryliertem oder unphosphoryliertem Zustand, Motor der Translokation in den Nukleus sind die so genannten Importine, die energieabhängig Transkriptionsfaktoren in den Zellkern befördern. Zwar ist STAT3 im unphosphorylierten Zustand nicht in der Lage seine charakteristische DNA-Genkassette im Zellkern zu binden, doch wird vermutet, dass es durch Heterodimerisierung mit anderen Transkriptionsfaktoren transkriptionelle Aufgaben wahrnimmt [63]. Eine Importin-Blockade könnte einen weiteren Wirkmechanismus von Cineol darstellen.

#### **6.4 Der Zusammenhang zwischen STAT3-Aktivität und eNOS-Expression**

In den Versuchen, die diese Arbeit begründen, konnte eine verminderte Phosphorylierung von STAT3 und eNOS an ihren aktivierenden Stellen unter Cineolbehandlung beschrieben werden. Die eNOS-Expression des Gesamtproteins verminderte sich ebenfalls. Diese Ergebnisse lassen nach einem Zusammenhang zwischen der verminderten Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 und einer verminderten Translation von eNOS fragen. Die Frage, die sich stellt ist, ob STAT3 als Transkriptionsfaktor für eNOS wirkt.

Eine überzeugende Studie in diesem Zusammenhang haben Yan *et al.* 2010 veröffentlicht. Sie führten ihre Versuche an humanen Endothelzellen durch und benutzten hemmende miRNS aus dem intronischen Teil des eNOS-Gens, um die mRNA- und Proteinlevel von eNOS, STAT3 und VEGF zu untersuchen. Sie erkannten nach Transfektion der miRNS in die Endothelzellen eine Erniedrigung des mRNA- und Proteinlevels von eNOS, aber auch von STAT3. Die VEGF-Expression blieb unverändert. Aus dem ersten Teil ihrer Versuche schlossen sie, dass STAT3 einen Einfluss auf die miRNS-vermittelte Regulation von eNOS haben könnte. Um dieser Vermutung auf den Grund zu gehen, wurde STAT3 in den endothelialen Zellen überexprimiert, in welchen die inhibierenden miRNS transfiziert war. Folglich wurde in diesen Zellen eNOS wieder vermehrt transkribiert und translatiert. STAT3 hat also einen miRNS-vermittelten positiven Einfluss auf die Expression von eNOS in endothelialen Zellen. Verminderte STAT3- und eNOS-Werte hatten darüber hinaus einen antiproliferativen Effekt [120]. Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Einklang zu bringen. Besonders erwähnenswert scheint, dass bei diversen Polypen (Patient 29, 33, 34 und 35, siehe Abbildung 15+17) die Phosphorylierung von STAT3 mit der Gesamtexpression von eNOS korreliert.

Auf der anderen Seite gibt es gegenseitige Aussagen über die eNOS/STAT3-Interaktion. Wie beschrieben induziert IL-6 eine STAT3-Phosphorylierung. Saura *et al.* beschreiben in menschlichen aortalen Endothelzellen eine verminderte eNOS-Expression nach IL-6-Behandlung. Dieser inhibierende Einfluss komme durch die Bindung von STAT3 an eine regulatorische DNS-Domäne des eNOS-Gens zustande [90]. Sud *et al.* [103] konnten berichten, dass Scherspannung in Endothelzellen von Schafen eine STAT3-Erniedrigung verursacht, was eine erhöhte eNOS-Expression zur Folge hat. Erneut sei hier auch auf die Ergebnisse von Peters *et al.* hingewiesen, die zwar erhöhte IL-6-Werte in CRSwNP nachwiesen, die aber keinen Einfluss auf die STAT3- Expression hatten [79].

Die zitierten Studien belegen einen Zusammenhang zwischen der STAT3-Aktivität und eNOS-Expression, welcher auch in dieser Arbeit aufgezeigt wurde. Es scheint, als könnte STAT3 die eNOS-Expression sowohl erhöhen, als auch erniedrigen. Es gibt eine ungenügende Anzahl von Studien zu diesem Thema, insbesondere auf dem Gebiet der CRSwNP, um diese Frage abschließend zu beantworten. Es scheint, als hätten Zelltypen, physikalische Stimuli und die Art der Liganden entscheidenden Einfluss auf die STAT3-vermittelten Effekte auf eNOS. In den Ergebnissen dieser Arbeit korreliert eine erniedrigte STAT3-Aktivierung positiv mit einer erniedrigten eNOS Expression.

## 6.5 Die Wirkung von Cineol auf Nostrin und Caspase 8

Nostrin und Caspase-8 sind zwei Proteine, die die Aktivität von eNOS beeinflussen können. Nostrin wirkt inhibierend auf die eNOS-Aktivität, indem es das eNOS-*trafficking* vom Plasmalemma, wo eNOS seine katalytische Aktivität entfaltet, in intrazytosolische Vesikel akzentuieren kann. Caspase-8 ist eine Caspase des extrinsischen Weges, vermittelt also apoptotische Signale von extrazellulär ins Zellinnere. Darüber hinaus kann sie, wie einleitend erwähnt, hemmend auf die Phosphorylierung von eNOS wirken.

In der Microarray-Analyse zeigten sich erniedrigte Werte der Transkripte sowohl von Caspase-8, als auch von Nostrin. Diese Ergebnisse sind gut mit einer erhöhten eNOS-Aktivität in nasalen Polypen vereinbar, da Caspase-8 in diesem Fall nicht mehr inhibierend auf die Phosphorylierung von eNOS wirken kann (vgl. Abb. 22) und Nostrin ein inhibierendes *trafficking* nicht ausüben kann. In dem orientierenden eNOS-*signaling*-Array zeigten sich überraschenderweise erniedrigte Transkripte von Caspase-8, Nostrin und eNOS. Der mögliche Einfluss von STAT3 auf die eNOS-Expression wurde zuvor erörtert. Interessanterweise ist auch Nostrin ein STAT3-abhängiges Protein. Wie bereits erwähnt, führt auf murinen Endothelzellen ein PECAM-*knock-out*, der normalerweise eine konstitutive STAT3-Aktivierung vermittelt, zu einer erniedrigten Nostrin-Expression. Die Erniedrigung des Nostrin-Transkripts unter Cineol-Behandlung, kann also mit der ebenso einhergehenden Erniedrigung der Phosphorylierungsrate von STAT3 in Verbindung gebracht werden: Eine verminderte STAT3-Aktivität zieht eine Verminderung des Nostrin-Transkripts nach sich.

Die Auswirkung auf eNOS wären eine verminderte zytoplasmatische Internalisierung und gesteigerte Aktivität. Die gesteigerte Aktivität von eNOS durch verminderte Nostrin-Expression steht im Gegensatz zu der vermutlich verminderten Aktivität von eNOS, die durch die pSTAT3 und peNOS-Senkung vermittelt wird (vgl. Abb 13, 15, 16). Die Expression von Nostrin auf Proteinebene unter dem Einfluss von Cineol ist uneinheitlich (vgl. Abb. 14). Die Expression steigt in 4 von 7 Polypen und im Median (Median=1,39). Diese Ergebnisse würden die These unterstützen, dass Cineol inhibierenden Einfluss auf den eNOS-Metabolismus hat. Demgegenüber sinkt sie jedoch in 3 von 7 Polypen. Dies mag zum einen der Heterogenität der Zelltypen und Geweben in nasalen Polypen geschuldet sein, zum anderen lässt sich aus diesem Ergebnis folgern, dass Cineol wahrscheinlich keinen Einfluss auf Nostrin hat und vielmehr die Phosphorylierung von eNOS und STAT3 beeinflusst. Diese Ergebnisse geben Anstoß die Expression von Nostrin

zunächst in einzelnen Zellreihen unter Einflussnahme von Cineol zu untersuchen, vor allem, da das Wissen um die Existenz dieses Proteins relativ neu ist und seine Funktionen unvollständig beschrieben sind [124].

Auch der Einfluss von Cineol auf Caspase-8 kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Unter Cineolbehandlung sinkt die Expression des Transkripts, wie im Falle von Nostrin. In der Western-Blot-Analyse, in der 7 Polypen auf die Expression von Caspase 8 untersucht wurden, steigerten überraschenderweise vier ihre Expression deutlich, ein Polyp zeigt keine Veränderung und bei zweien sinkt die Expression. Diese Tendenz zur Expressionssteigerung von Caspase-8 unter Cineolbehandlung ist gut mit dem inhibierenden Einfluss auf die eNOS-Phosphorylierung in Verbindung zu bringen, da eine erhöhte Aktivität von Caspase-8 eine verminderte Phosphorylierung von eNOS nach sich ziehen kann [73]. Auch würde eine Steigerung der Apoptose bei einem proliferativen Prozess wie CRSwNP durchaus als positiv angesehen werden können. Es sollten zunächst Versuche an einzelnen Zellreihen durchgeführt werden. Zudem gibt es in der aktuellen Literatur keine Studie zu der Rolle von Caspase-8 in CRSwNP.

## **6.6 Die Wirkung von Cineol auf die iNOS und die NO-Produktion**

Watkins *et al.* haben gezeigt, dass die iNOS-Expression in nasalen Polypen im Vergleich zur korrespondierenden Nasenmuschel erhöht ist [114]. Dies wiesen sie auf RNS und Proteinebene mittels Southern-Blot, *in-situ*-Hybridisierung, Western-Blot-Analyse und Immunhistochemie nach. Sie postulieren darüber hinaus, dass die Expression auf das Polypenepithel beschränkt ist [114]. Furakawa *et al.* konnten darüber hinaus schwache bis moderate Expression von iNOS auch in Endothel, glatten Muskelzellen, submukösen Drüsen und inflammatorischen Zellen nachweisen. Allein die Expression von iNOS im Epithel korrelierte jedoch mit der Schwere der Entzündung im polypösen Gewebe. Vor allem, was die iNOS-Expression im Endothel betrifft, ist die Frage nach Kreuzreaktivität mit eNOS zu stellen, da eine iNOS-Expression in endothelialen Zellen ungewöhnlich ist. Die erhöhte iNOS-Expression im apikalen Epithel, die sowohl Watkins *et al.*, als auch Furakawa *et al.* nachweisen konnten, ist gut mit der Abwehr von Mikroorganismen in Einklang zu bringen. Diese Aufgabe übernimmt NO an der epithelialen Grenzfläche des oberen Respirationstrakts mit der Umwelt [43]. In dieser Arbeit konnte auch eine erhöhte Phosphorylierung von eNOS in diesem Bereich nachgewiesen werden. Der Beitrag von iNOS zur vaskulären Hämostase und glandulärer Funktion bleibt bislang ungeklärt. So scheint eine Beteiligung möglich, vor allem, da Furakawa *et al.* auch im Endothel und in

glandulären Strukturen iNOS nachwies. Auch Muluk *et al.* konnten iNOS immunhistochemisch in subepithelialen glandulären Strukturen und im Endothel nachweisen [71]. Allerdings fehlte in diesen Bereichen eine iNOS-RNS-Positivität, was eine Kreuzreaktion mit eNOS möglich macht. Eine Expression dieser RNS konnte demgegenüber in inflammatorischen Zellen gefunden werden [32].

In dieser Arbeit konnte an zwölf Polypen gezeigt werden, dass Cineol die iNOS-Expression nicht einheitlich beeinflusst. Drei Polypen erhöhten ihre Expression, sechs erniedrigten sie und bei dreien zeigte sich so gut wie keine Änderung. Bei sechs von zwölf Polypen kann Cineol also eine verminderte Expression erreichen. Die Gründe für diese Erniedrigung bleiben unklar. Die Vermutung liegt nahe, dass eine verminderte Phosphorylierung von STAT3 zu einer Minderexpression von iNOS führt. Es gibt jedoch zwei Quellen, die diese Hypothese widerlegen. Queval *et al.* [81] haben Studien an humanen Makrophagen durchgeführt, welche mit *Mycobacterium tuberculosis* infiziert waren. In diesen Zellen lag eine erhöhte Aktivität von STAT3 vor, was eine Verminderung von iNOS nach sich zog. In murinen Kardiomyozyten führte eine STAT3-Induktion ebenfalls zu einer Minderexpression von iNOS und zu Apoptose. STAT3 reguliert die iNOS-Expression direkt negativ durch Bindung an die Promoterregion der iNOS-DNS. Diese Studie unterstreicht wiederum antiapoptotische Wirkung von STAT3 [102]. Keine der beiden Studien trifft jedoch eine Aussage über STAT3 und iNOS in CRSwNP und es gibt hierzu keinerlei Literatur, sodass es Aufgabe nachkommender Arbeiten sein muss diesen Zusammenhang genauer in CRSwNP zu betrachten.

Interessanterweise korreliert die iNOS-Veränderung positiv mit der NO-Produktion. Dieser Umstand ist gut mit der aktuellen Literatur zu vereinbaren, die davon ausgeht, dass iNOS der Hauptproduzent von NO ist [7]. Gelingt es also die iNOS-Expression zu senken, sinkt ebenso die NO-Menge. Schwierig bleibt jedoch Interpretation dieses Umstandes. Watkins *et al.* [114] haben nachgewiesen, dass iNOS in CRSwNP im Vergleich zur korrespondierenden Nasenmuschelschleimhaut erhöht ist. So scheint eine Senkung der iNOS-Expression durch Cineol und somit eine Rekonstitution zur Expression von iNOS auf Nasenmuskelnmukosaniveau als physiologisch sinnvoll, da das produzierte NO, wie oben beschrieben ödemfördernde Wirkung hat, insbesondere, wenn es nach Furakawa *et al.* auch in subepithelialen Strukturen exprimiert ist [32]. Interessant scheint auch eine Betrachtung von Stickstoffmonoxid auf die T-Helferzell-Differenzierung zu sein. So gibt es Studien, die propagieren, dass NO einen inhibierenden Einfluss auf die Th1-Antwort hat

[75] und stimulierend Einfluss auf die Th2-Antwort wirkt [11]. Eine andere Arbeit postuliert, dass NO auf beide Differenzierungen inhibierend wirkt [6]. Gerade die zwei erst genannten Studien scheinen in diesem Zusammenhang interessant, da sie einen Beitrag zur Ätiopathogenese der CRSwNP leisten. Durch die pathologisch erhöhte iNOS-Expression und erhöhte eNOS-Aktivität kommt es im polypösen Gewebe zu einer erhöhten NO-Konzentration, was ein Ungleichgewicht zwischen Th2- und Th1- Antwort zu Gunsten der ersteren bedingt und das Bild einer Th2-dominierten chronischen Entzündung mit Eosinophilie erklärt. In der Literatur gibt es jedoch kein einheitliches Bild, wie Stickstoffmonoxid auf die T-Helferzellendifferenzierung Einfluss nimmt. Ein interessanter Ansatz wäre es, zu klären, ob eine unselektive NOS-Inhibition und damit eine NO-Depletion zu einer Verringerung der Th2- Antwort führen kann und morphologische Merkmale wie subepitheliales Ödem und Becherzellhypertrophie verringert könnte. Als unselektiver NOS-Inhibitor steht N $\omega$ -Nitro-L-Arginine-methyl-ester-hydrochlorid (L-NAME) zur Verfügung.

Diese Arbeit kann die Rolle von iNOS und NO und ihre Beeinflussung durch Cineol in CRSwNP nicht umfassend beantworten. Zu vielseitig sind die Funktionen von NO in Gesundheit und Krankheit und zu vielfältig scheinen die einzelnen Funktionen in verschiedenen Geweben zu sein. Es können jedoch interessante Einblicke in den Metabolismus von iNOS und NO in CRSwNP dargestellt werden und Ansätze für weiterführenden Arbeiten aufgezeigt werden.

## **6.7 Ausblick**

Die Funktion von Cineol als antiinflammatorisch wirkendem sekundären Pflanzenstoff ist unumstritten. Molekulare Mechanismen seiner Wirkung sind jedoch wenige bekannt. Als Reprise sei hier an den steroideinparenden Effekt von Cineol bei Asthma bronchiale erinnert [50]. Einen solchen Effekt bei CRSwNP können nur klinische Studien zeigen. STAT3 hat in seiner aktivierenden Form die Aufgabe proinflammatorische und antiapoptotische Proteine abzulesen. Eine verminderte Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors unter Einflussnahme von Cineol scheint die der CRSwNP zugrundeliegende Entzündung abschwächen zu können. Auch gibt diese Arbeit Anlass, an die Expression und Phosphorylierungsraten von eNOS und STAT3 im unteren Respirationstrakt zu denken. Kann Cineol auch hier wie in CRSwNP wirken? Bei kindlichem allergischen Asthma ist die exhalierte NO-Menge ein negativer Prädiktor und zeugt von entzündlicher Aktivität [5]. Es könnte möglich sein, die Entzündung über einen

STAT3-vermittelten Signalweg zu bremsen, was sich der Studie von Juergens *et al.* als Steroidersparnis gezeigt haben kann. Die NO-Produktion der unteren Atemwege gilt als iNOS-vermittelt [5], doch scheint auch eine Betrachtung von eNOS und STAT 3 bei entzündlichen Erkrankungen der Lunge interessant, gerade da CRSwNP und allergisches Asthma Komorbiditäten darstellen und Th2-polarisierte Erkrankungen sind.

Unumgänglich ist auch eine Betrachtung der Expression und Phosphorylierung der Tyrosinkinase unter Cineoleinfluss, welche STAT3 und eNOS vorgeschaltet sind; im engeren Sinne sind dies EGF, VEGF und JAK2. Die Hypothese, dass Cineol eine unspezifische Tyrosinkinaseinhibition erreicht, könnte dadurch vertiefend diskutiert werden.

## **7 Zusammenfassung**

Die Stickstoffmonoxidsynthasen stellen Stickstoffmonoxid her. Sowohl die Verteilung der einzelnen Isoformen, als auch die Funktionen dieses gasförmigen Transmitters in unterschiedlichen Geweben unterliegen einer erstaunlichen Breite.

Ziel dieser Arbeit war es einen Einblick in den Stickstoffmonoxidmechanismus in CRSwNP zu erlangen und die Einflussnahme von 1,8-Cineol zu studieren. Hauptaugenmerk lag hierbei auf der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase. Hierzu wurden molekulargenetische und biochemische Untersuchungsmethoden verwendet, um die Expression der verschiedenen Akteure zu untersuchen.

Die Zusammenschau der Ergebnisse und aktueller Literatur ergibt, dass in nasalen Polypen von Patienten mit CRSwNP eine erhöhte Aktivität von eNOS und STAT3 vorliegt. Die Effekte dieser Dysregulation erklären viele morphologische und molekulargenetische Aspekte dieser entzündlichen proliferativen Erkrankung. Mit Cineol scheint ein Phytotherapeutikum gefunden worden zu sein, dass die Phosphorylierung von STAT3 und eNOS senken kann. Als Mechanismus kommt eine unspezifische Tyrosinkinaseinhibition in Frage. Die Bedeutung von Caspase-8 und Nostrin, zwei Proteinen, die vor allem die Aktivität von eNOS beeinflussen, kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden, doch geben die Ergebnisse interessante Einblicke in die vermutliche Rolle dieser regulierenden Proteine und fordern weitergehende Experimente. In der Mehrheit der Fälle kommt es unter Behandlung mit Cineol auch bei der iNOS-Expression auch zu einer Erniedrigung, darüber hinaus korreliert die NO-Produktion positiv mit einer Änderung der iNOS Expression.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind Teil des Verständnisses der Wirkung von Cineol und sollen zukünftigen klinischen Therapieoptionen der CRSwNP den Weg ebnen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Alobid I, Cardelus S, Benítez P, Guilemany JM, Roca-Ferrer J, Picado C, Bernal-Sprekelsen M, Mullol J (2011) Persistent asthma has an accumulative impact on the loss of smell in patients with nasal polyposis. *Rhinology* 49(5):519–524
2. Bachert C, Claeys SEM, Tomassen P, van Zele T, Zhang N (2010) Rhinosinusitis and asthma: a link for asthma severity. *Curr Allergy Asthma Rep* 10(3):194–201
3. Baek SH, Lee JH, Kim C, et al (2017) Ginkgolic Acid C 17:1, Derived from Ginkgo biloba Leaves, Suppresses Constitutive and Inducible STAT3 Activation through Induction of PTEN and SHP-1 Tyrosine Phosphatase. *Mol Basel Switz*. doi: 10.3390/molecules22020276
4. Balunas MJ, Kinghorn AD (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci* 78(5):431–441
5. Barnes PJ, Kharitonov SA (1996) Exhaled nitric oxide: a new lung function test. *Thorax* 51(3):233
6. Beck K-F, Bernd Sterzel R (1996) Cloning and sequencing of the proximal promoter of the rat iNOS gene: activation of NFκB is not sufficient for transcription of the iNOS gene in rat mesangial cells. *FEBS Lett* 394(3):263–267
7. Beck K-F, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H, Pfeilschifter J (1999) Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol* 202(6):645–653
8. Bulek K, Swaidani S, Aronica M, Li X (2010) Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity. *Immunol Cell Biol* 88(3):257–268
9. Cao Q, Zhang T, Zhang J (2015) Correlation analysis of STAT3 and VEGF expression and eosinophil infiltration in nasal polyps. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg* 272(8):1955–1960
10. Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 443(3):285–289
11. Chen PF, Wu KK (2000) Characterization of the roles of the 594-645 region in human endothelial nitric-oxide synthase in regulating calmodulin binding and electron transfer. *J Biol Chem* 275(17):13155–13163
12. Chester AC, Antisdell JL, Sindwani R (2009) Symptom-specific outcomes of endoscopic sinus surgery: a systematic review. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg* 140(5):633–639
13. Chien C-Y, Tai C-F, Ho K-Y, Kuo W-R, Chai C-Y, Hsu Y-C, Wang L-F (2008) Expression of hypoxia-inducible factor 1α in the nasal polyps by real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg* 139(2):206–210

14. Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C (1992) Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176(2):599–604
15. Couto LGF, Fernades AM, Brandão DF, de Santi Neto D, Valera FCP, Anselmo-Lima WT (2008) Histological aspects of rhinosinusal polyps. *Braz J Otorhinolaryngol* 74(2):207–212
16. Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D, Friebe A (2010) Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition: Platelet function in mice lacking GC. *J Thromb Haemost* 8(6):1343–1352
17. Dedio J, König P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Müller-Esterl W (2001) NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 15(1):79–89
18. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T (2006) The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:235–276
19. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495–516
20. Erwin PA, Mitchell DA, Sartoretto J, Marletta MA, Michel T (2006) Subcellular Targeting and Differential S-Nitrosylation of Endothelial Nitric-oxide Synthase. *J Biol Chem* 281(1):151–157
21. Ferrer-Sueta G, Radi R (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* 4(3):161–177
22. Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 27(2–3):126–139
23. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R (2001) Phosphorylation of Thr495 regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88(11):e68–e75
24. Fokkens W, Lund V, Mullol J, European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps Group (2007) EP3OS 2007: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* 45(2):97–101
25. Foreman A, Holtappels G, Psaltis AJ, Jervis-Bardy J, Field J, Wormald P-J, Bachert C (2011) Adaptive immune responses in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated chronic rhinosinusitis. *Allergy* 66(11):1449–1456
26. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23(6 Pt 2):1121–1131
27. Freeman AF, Holland SM (2008) The Hyper-IgE Syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am* 28(2):277–291
28. de Freitas RM, da Costa Maranduba CM (2015) Myeloproliferative neoplasms and the JAK/STAT signaling pathway: an overview. *Rev Bras Hematol E Hemoter* 37(5):348–353

29. Friebe A (2003) Regulation of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase. *Circ Res* 93(2):96–105
30. de Frutos null, Sánchez de Miguel L, Farré J, Gómez J, Romero J, Marcos-Alberca P, Nuñez A, Rico L, López-Farré A (2001) Expression of an endothelial-type nitric oxide synthase isoform in human neutrophils: modification by tumor necrosis factor-alpha and during acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 37(3):800–807
31. Fulton D, Gratton J-P, Sessa WC (2001) Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299(3):818–824
32. Furukawa K, Harrison DG, Saleh D, Shennib H, Chagnon FP, Giaid A (1996) Expression of nitric oxide synthase in the human nasal mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 153(2):847–850
33. Geiger JL, Grandis JR, Bauman JE (2016) The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncol* 56:84–92
34. Gervais FG, Cruz RP, Chateauneuf A, Gale S, Sawyer N, Nantel F, Metters KM, O'neill GP (2001) Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD2 receptors CRTH2 and DP. *J Allergy Clin Immunol* 108(6):982–988
35. Greiner JF-W, Müller J, Zeuner M-T, et al (2013) 1,8-Cineol inhibits nuclear translocation of NF-κB p65 and NF-κB-dependent transcriptional activity. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1833(12):2866–2878
36. Hadfield PJ, Rowe-Jones JM, Mackay IS (2000) The prevalence of nasal polyps in adults with cystic fibrosis. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 25(1):19–22
37. Hanazawa T, Tanaka K, Chiba T, Konno A (1997) Distribution and origin of nitric oxide synthase-containing nerve fibers in human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 117(5):735–737
38. Hess DT, Matsumoto A, Kim S-O, Marshall HE, Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(2):150–166
39. Hissaria P, Smith W, Wormald PJ, Taylor J, Vadas M, Gillis D, Kette F (2006) Short course of systemic corticosteroids in sinonasal polyposis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with evaluation of outcome measures. *J Allergy Clin Immunol* 118(1):128–133
40. Hopkins C, Browne JP, Slack R, Lund V, Topham J, Reeves B, Copley L, Brown P, Van Der Meulen J (2006) The national comparative audit of surgery for nasal polyposis and chronic rhinosinusitis. *Clin Otolaryngol* 31(5):390–398
41. Hoyt AEW, Borish L, Gurrola J, Payne S (2016) Allergic Fungal Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 4(4):599–604
42. Hu K-H, Lee F-P, Cheng Y-J, Huang H-M (2007) Vascular endothelial growth factor and children featuring nasal polyps. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71(1):23–28
43. Ibiza S, Serrador JM (2008) The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses. *Inmunología* 27(3):103–117

44. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 84(24):9265–9269
45. Jarvis D, Newson R, Lotvall J, et al (2012) Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: The GA2LEN survey in Europe: Asthma and chronic rhinosinusitis. *Allergy* 67(1):91–98
46. Jeon YJ, Jung S-N, Yun J, Lee CW, Choi J, Lee Y-J, Han DC, Kwon B-M (2015) Ginkgetin inhibits the growth of DU-145 prostate cancer cells through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 activity. *Cancer Sci* 106(4):413–420
47. Jing N, Tweardy DJ (2005) Targeting Stat3 in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 16(6):601–607
48. Johansson L, Akerlund A, Holmberg K, Melén I, Bende M (2003) Prevalence of nasal polyps in adults: the Skövde population-based study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112(7):625–629
49. Johnston PA, Grandis JR (2011) STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges. *Mol Interv* 11(1):18
50. Juergens UR, Dethlefsen U, Steinkamp G, Gillissen A, Repges R, Vetter H (2003) Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respir Med* 97(3):250–256
51. Juergens UR, Stöber M, Vetter H (1998) Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1.8-cineole) in human blood monocytes in vitro. *Eur J Med Res* 3(11):508–510
52. Kawamoto H, Takumida M, Takeno S, Watanabe H, Fukushima N, Yajin K (1998) Localization of nitric oxide synthase in human nasal mucosa with nasal allergy. *Acta Oto-Laryngol Suppl* 539:65–70
53. Kehrl W, Sonnemann U, Dethlefsen U (2004) Therapy for acute nonpurulent rhinosinusitis with cineole: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *The Laryngoscope* 114(4):738–742
54. Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, Grammer LC, Schleimer RP (2008) Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: An immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol* 22(6):549
55. Kirtsreesakul V, Wongsritrang K, Ruttanaphol S (2011) Clinical efficacy of a short course of systemic steroids in nasal polyposis. *Rhinology* 49(5):525–532
56. Kleinbongard P (2006) Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 107(7):2943–2951
57. Klossek JM, Neukirch F, Pribil C, Jankowski R, Serrano E, Chanal I, El Hasnaoui A (2005) Prevalence of nasal polyposis in France: a cross-sectional, case-control study. *Allergy* 60(2):233–237

58. Knipping S, Holzhausen H, Berghaus A, Bloching M, Riederer A (2005) Ultrastructural detection of nitric oxide in human nasal mucosa. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132(4):620–625
59. Larsen K (1996) The clinical relationship of nasal polyps to asthma. *Allergy Asthma Proc* 17(5):243–249
60. Lazzari C, Bulotta A, Ducceschi M, Viganò MG, Brioschi E, Corti F, Gianni L, Gregorc V (2017) Historical Evolution of Second-Line Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Med* 4:4
61. Lee HS, Myers A, Kim J (2009) Vascular Endothelial Growth Factor Drives Autocrine Epithelial Cell Proliferation and Survival in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis. *Am J Respir Crit Care Med* 180(11):1056–1067
62. Linke R, Pries R, Könnecke M, Bruchhage KL, Böske R, Gebhard M, Wollenberg B (2013) Increased Activation and Differentiated Localization of Native and Phosphorylated STAT3 in Nasal Polyps. *Int Arch Allergy Immunol* 162(4):290–298
63. Liu L, McBride KM, Reich NC (2005) STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- $\alpha$ 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(23):8150–8155
64. Lowenstein CJ, Michel T (2006) What's in a name? eNOS and anaphylactic shock. *J Clin Invest* 116(8):2075–2078
65. McCormick ME, Goel R, Fulton D, Oess S, Newman D, Tzima E (2011) Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Regulates Endothelial NO Synthase Activity and Localization Through Signal Transducers and Activators of Transcription 3-Dependent NOSTRIN Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(3):643–649
66. Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T (1997) Caveolin versus calmodulin counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272(41):25907–25912
67. Michell BJ (2001) Coordinated Control of Endothelial Nitric-oxide Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the cAMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 276(21):17625–17628
68. Miclescu A, Gordh T (2009) Nitric oxide and pain: ?Something old, something new? *Acta Anaesthesiol Scand* 53(9):1107–1120
69. Miles-Lawrence R, Kaplan M, Chang K (1982) Methcholine sensitivity in nasal polyposis and the effects of polypectomy. *J Allergy Clin Immunol* 69(1):102
70. Mostafa BE, Abdel Hay H, Mohammed HE, Yamani M (2005) Role of leukotriene inhibitors in the postoperative management of nasal polyps. *ORL J Oto-Rhino-Laryngol Its Relat Spec* 67(3):148–153
71. Muluk NB, Arikan OK, Atasoy P, Kiliç R, Yalçinozan ET (2013) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in sinonasal polyp pathogenesis. *B-ENT* 9(3):207–216

72. Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M (2011) Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharm Biol* 49(9):893–899
73. Na H-J, Hwang J-Y, Lee K-S, et al (2014) TRAIL negatively regulates VEGF-induced angiogenesis via caspase-8-mediated enzymatic and non-enzymatic functions. *Angiogenesis* 17(1):179–194
74. Okano M, Fujiwara T, Yamamoto M, et al (2006) Role of prostaglandin D2 and E2 terminal synthases in chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Allergy* 36(8):1028–1038
75. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122):524–526
76. Patou J, Gevaert P, Van Zele T, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C (2008) Staphylococcus aureus enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 121(1):110–115
77. Payne SC, Borish L, Steinke JW (2011) Genetics and phenotyping in chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 128(4):710-720-722
78. Pérez-Novo CA, Watelet JB, Claeys C, Van Cauwenberge P, Bachert C (2005) Prostaglandin, leukotriene, and lipoxin balance in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 115(6):1189–1196
79. Peters AT, Kato A, Zhang N, et al (2010) Evidence for altered activity of the IL-6 pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 125(2):397–403.e10
80. Psaltis AJ, Weitzel EK, Ha KR, Wormald P-J (2008) The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am J Rhinol* 22(1):1–6
81. Queval CJ, Song O-R, Deboosère N, et al (2016) STAT3 Represses Nitric Oxide Synthesis in Human Macrophages upon Mycobacterium tuberculosis Infection. *Sci Rep* 6:29297
82. Rawlings JS (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117(8):1281–1283
83. Ren Y, Huang S, Wang X, Lou Z, Yao X, Weng G (2016) Ginkgetin induces apoptosis in 786-O cell line via suppression of JAK2-STAT3 pathway. *Iran J Basic Med Sci* 19(11):1245
84. Resouly A (1972) Kartagener's syndrome. A case report and review of the literature. *J Laryngol Otol* 86(12):1237–1240
85. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68(4):673–682
86. Samter M, Beers RF (1967) Concerning the nature of intolerance to aspirin. *J Allergy* 40(5):281–293
87. Santos FA, Rao VS (2000) Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res PTR* 14(4):240–244
88. Santos FA, Rao VSN (2002) Possible role of mast cells in cineole-induced scratching behavior in mice. *Food Chem Toxicol* 40(10):1453–1457

89. Santos FA, Silva RM, Campos AR, De Araújo RP, Lima Júnior RCP, Rao VSN (2004) 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 42(4):579–584
90. Saura M, Zaragoza C, Bao C, Herranz B, Rodriguez-Puyol M, Lowenstein CJ (2006) Stat3 Mediates Interleukin-6 Inhibition of Human Endothelial Nitric-oxide Synthase Expression. *J Biol Chem* 281(40):30057–30062
91. Schiavino D, Nucera E, Milani A, Del Ninno M, Buonomo A, Sun J, Patriarca G (2000) The aspirin disease. *Thorax* 55(suppl 2):S66–S69
92. Schilling K, Opitz N, Wiesenthal A, Oess S, Tikkanen R, Müller-Esterl W, Icking A (2006) Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. *Mol Biol Cell* 17(9):3870–3880
93. Schonhoff CM, Gaston B, Mannick JB (2003) Nitrosylation of Cytochrome c during Apoptosis. *J Biol Chem* 278(20):18265–18270
94. Settipane GA (1996) Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc* 17(5):231–236
95. Shaul PW, Anderson RG (1998) Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* 275(5 Pt 1):L843–851
96. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T (1996) Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271(11):6518–6522
97. Shin S-H, Ponikau JU, Sherris DA, Congdon D, Frigas E, Homburger HA, Swanson MC, Gleich GJ, Kita H (2004) Chronic rhinosinusitis: An enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J Allergy Clin Immunol* 114(6):1369–1375
98. Smith TL, Batra PS, Seiden AM, Hannley M (2005) Evidence supporting endoscopic sinus surgery in the management of adult chronic rhinosinusitis: a systematic review. *Am J Rhinol* 19(6):537–543
99. Spector SL, Wangaard CH, Farr RS (1979) Aspirin and concomitant idiosyncrasies in adult asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 64(6 Pt 1):500–506
100. Steinke JW, Bradley D, Arango P, Crouse CD, Frierson H, Kountakis SE, Kraft M, Borish L (2003) Cysteinyl leukotriene expression in chronic hyperplastic sinusitis-nasal polyposis: importance to eosinophilia and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111(2):342–349
101. Stewart RA, Ram B, Hamilton G, Weiner J, Kane KJ (2008) Montelukast as an adjunct to oral and inhaled steroid therapy in chronic nasal polyposis. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg* 139(5):682–687
102. Su S-A, Yang D, Zhu W, Cai Z, Zhang N, Zhao L, Wang J-A, Xiang M (2016) Interleukin-17A mediates cardiomyocyte apoptosis through Stat3-iNOS pathway. *Biochim Biophys Acta* 1863(11):2784–2794
103. Sud N, Kumar S, Wedgwood S, Black SM (2009) Modulation of PKC signaling alters the shear stress-mediated increases in endothelial nitric oxide synthase transcription: role of STAT3. *AJP Lung Cell Mol Physiol* 296(3):L519–L526

104. Sudhoff H, Klenke C, Greiner JFW, Müller J, Brotzmann V, Ebmeyer J, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2015) 1,8-Cineol Reduces Mucus-Production in a Novel Human Ex Vivo Model of Late Rhinosinusitis. *PLOS ONE* 10(7):e0133040
105. Sun D, Matsune S, Ohori J, Fukuiwa T, Ushikai M, Kurono Y (2005) TNF-alpha and endotoxin increase hypoxia-induced VEGF production by cultured human nasal fibroblasts in synergistic fashion. *Auris Nasus Larynx* 32(3):243–249
106. Tousoulis D, Kampoli A-M, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C (2012) The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* 10(1):4–18
107. Tripathi A, Conley DB, Grammer LC, Ditto AM, Lowery MM, Seiberling KA, Yarnold PA, Zeifer B, Kern RC (2004) Immunoglobulin E to Staphylococcal and Streptococcal Toxins in Patients with Chronic Sinusitis/Nasal Polyposis. *The Laryngoscope* 114(10):1822–1826
108. Trivedi S, Srivastava RM, Concha-Benavente F, Ferrone S, Garcia-Bates TM, Li J, Ferris RL (2016) Anti-EGFR Targeted Monoclonal Antibody Isotype Influences Antitumor Cellular Immunity in Head and Neck Cancer Patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 22(21):5229–5237
109. Vaidyanathan S, Barnes M, Williamson P, Hopkinson P, Donnan PT, Lipworth B (2011) Treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis with oral steroids followed by topical steroids: a randomized trial. *Ann Intern Med* 154(5):293–302
110. Van Zele T, Gevaert P, Holtappels G, et al (2010) Oral steroids and doxycycline: two different approaches to treat nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 125(5):1069–1076.e4
111. Vannini F, Kashfi K, Nath N (2015) The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol* 6:334–343
112. Videler WJ, Badia L, Harvey RJ, et al (2011) Lack of efficacy of long-term, low-dose azithromycin in chronic rhinosinusitis: a randomized controlled trial: No efficacy of macrolides in chronic rhinosinusitis. *Allergy* 66(11):1457–1468
113. Wallwork B, Coman W, Mackay-Sim A, Greiff L, Cervin A (2006) A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Macrolide in the Treatment of Chronic Rhinosinusitis: *The Laryngoscope* 116(2):189–193
114. Watkins DN, Lewis RH, Basclain KA, Fisher PH, Peroni DJ, Garlepp MJ, Thompson PJ (1998) Expression and localization of the inducible isoform of nitric oxide synthase in nasal polyp epithelium. *Clin Exp Allergy* 28(2):211–219
115. Widal F, Abrami P, Lermoyez J (1993) Anaphylaxie et Idiosyncrasie. *Allergy Asthma Proc* 14(5):373–376
116. Wittekindt C, Hess A, Bloch W, Sultanie S, Michel O (2002) Immunohistochemical expression of VEGF and VEGF receptors in nasal polyps as compared to normal turbinate mucosa. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg* 259(6):294–298
117. Worth H, Schacher C, Dethlefsen U (2009) Concomitant therapy with Cineole (Eucalyptole) reduces exacerbations in COPD: A placebo-controlled double-blind trial. *Respir Res*. doi: 10.1186/1465-9921-10-69

118. Wright ED, Agrawal S (2007) Impact of perioperative systemic steroids on surgical outcomes in patients with chronic rhinosinusitis with polyposis: evaluation with the novel Perioperative Sinus Endoscopy (POSE) scoring system. *The Laryngoscope* 117(11 Pt 2 Suppl 115):1–28
119. Xu G-BS (2014) Curcumin suppresses invasiveness and vasculogenic mimicry of squamous cell carcinoma of the larynx through the inhibition of JAK-2/STAT-3 signaling pathway. *prostate* 8:13
120. Yan L, Hao H, Elton TS, Liu Z, Ou H (2011) Intronic microRNA suppresses endothelial nitric oxide synthase expression and endothelial cell proliferation via inhibition of STAT3 signaling. *Mol Cell Biochem* 357(1–2):9–19
121. Yuan G, Wahlqvist ML, He G, Yang M, Li D (2006) Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac J Clin Nutr* 15(2):143
122. Zele TV, Gevaert P, Watelet J-B, Claeys G, Holtappels G, Claeys C, Cauwenberge P van, Bachert C (2004) *Staphylococcus aureus* colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 114(4):981–983
123. Zhu W, Murrell GA, Lin J, Gardiner EM, Diwan AD (2002) Localization of nitric oxide synthases during fracture healing. *J Bone Miner Res* 17(8):1470–1477
124. Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, Renné C, Müller-Esterl W, Oess S (2002) NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci* 99(26):17167–17172
125. Orphanet: Laron Syndrom. [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Expert=633&lng=DE](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=633&lng=DE), Zugriff am 6. März 2017

## **9 Formel- und Tabellenverzeichnis**

### **9.1 Formelverzeichnis**

Formel 1: Hyperoxid-Anionbildung.....	18
Formel 2: Bildung hochreaktiver DNS-schädigender Spezies .....	18
Formel 3: Ermittlung des $\Delta$ CT-Wertes .....	32
Formel 4: Ermittlung des $\Delta\Delta$ CT-Wertes .....	32
Formel 5: Ermittlung der relativen Häufigkeit .....	32
Formel 6: Ermittlung der Nitritkonzentration in $\mu$ L.....	38

### **9.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Häufigkeit von verschiedenen Polypeptiden nach Couto et al. [18] .....	6
Tabelle 2: Primärantikörper.....	24
Tabelle 3: Sekundärantikörper.....	24
Tabelle 4: Gewebe und Verwendung in dieser Arbeit .....	25
Tabelle 5: Materialien der cDNS-Synthese .....	31
Tabelle 6: Ablauf der cDNS-Synthese .....	31
Tabelle 7: Komponenten für den eNOS signaling array .....	32
Tabelle 8: Enzyminhibitoren im Lysispuffer mit Endkonzentration.....	33
Tabelle 9: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele .....	34
Tabelle 10: Ablauf des iNOS-ELISAs .....	36
Tabelle 11: Ablauf der kalorimetrischen NO-Messung .....	38

## **10 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematischer Ablauf von der Ligandenbindung an einer Tyrosinkinase bis zur STAT-Translokation .....	12
Abbildung 2: Schematisch dargestellter Elektronenfluss in einer Stickstoffsynthese .....	14
Abbildung 3: Schematische Darstellungen der zwei Wirkungsweisen von NO im menschlichen Organismus.....	18
Abbildung 4: Schematischer Ablauf eines Sandwich-ELISAs .....	36
Abbildung 5: Repräsentative Standardkurve des iNOS ELISAs.....	37
Abbildung 6: Standardkurve der kalorimetrischen NO-Messung .....	39
Abbildung 7: Beispiel eines entwickelten Phosphokinasearrays .....	40
Abbildung 8: Relative Expression von NOSTRIN, eNOS und CASPASE 8 in der Microarray-Analyse .....	43
Abbildung 9: Expressionsprofile von drei nasalen Polypen bezüglich eNOS, p-eNOS und GAPDH.....	44
Abbildung 10: Statistische Ergebnisse der WB-Analyse im Vergleich zur gesunden unteren Nasenmuschel.....	45
Abbildung 11: Phosphokinasearray: Phosphorylierungsgrad von eNOS in nasalen Polypen und unterer Nasenmuschel .....	46
Abbildung 12: Immunfluoreszenz: Darstellung von eNOS, p-eNOS und DAPI als Kernfärbung .....	46
Abbildung 13: Relative Expression der Gene von NOSTRIN, eNOS und Caspase 8 unter Cineolbehandlung.....	48
Abbildung 14: Phosphokinasearray: Darstellung der Phosphorylierung von eNOS unter Cineolbehandlung.....	49
Abbildung 15: Proteinexpression von eNOS und p-eNOS in nasalen Polypen unter Cineolbehandlung.....	50
Abbildung 16: Darstellung der Expression von eNOS, p-eNOS und ihres Quotienten unter Cineolbehandlung.....	51
Abbildung 17: Expressionsprofile von eNOS und p-eNOS in nasalen Polypen unter Cineolbehandlung.....	52
Abbildung 18: Darstellung der Expression von STAT 3, p-STAT 3 und ihres Quotienten unter Cineolbehandlung .....	53

Abbildung 19: Western-Blotting-Analysen von nasalen Polypen unter Cineolbehandlung auf Caspase 8 und Nostrin.....	54
Abbildung 20: Auswertung der Nostrin und Caspase-8- Western-Blotting-Analysen .....	54
Abbildung 21: Ergebnisse des iNOS-ELISAs und der NO-realease Assays .....	56

## **11 Abürzungsverzeichnis**

AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ASS	Acetylsalicylsäuren
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i> (Name eines Proteins)
ca.	zirka
CaM	Calmodulin
Caspase, CASP	<i>Cysteine-Dependent Aspartate-Specific Protease</i>
cGMP	zyklische Guanosinmonophosphat
eNOS	konstitutive Stickstomonoxidsynthase
COX	Zyklooxygenase
CRS <sub>n</sub> NP	chronische Rhinositis ohne nasale Polypen
CRS <sub>w</sub> NP	chronische Rhinositis mit nasalen Polypen
CT	Computertomographie
DAPI	Diamidin-phenyllindol
DMEM	<i>Dulbecco/Vogt modified Eagles's minimal essential medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EGF	<i>epitheliale growth factor</i>
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
eNOS	endotheliale Stickstomonoxidsynthase
et al.	<i>et alii</i> (lateinisch für und andere)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FESS	funktionale endoskopische Nasennebenhöhlenoperation
FMN	Flavinmononukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
GOLD	Global Initiative For Chronic Obstruktive Lung Disease

GTP	Guanosintriphosphat
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
HRT	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilicale vein endothelial cells</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
iNOS	induzierbare Stickstomonoxidsynthase
IκB	<i>inhibitor of nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
JAK	Januskopfkinase
L-NAME	Nω-Nitro-L-Arginine-methyl-ester hydrochlorid
LPS	Lipopolysaccharide
Mcl	<i>induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i> (Name eines Proteins)
MTT	Dimethylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid
MUC	Muzin
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NM	Nasenmuschel
nNOS	neuronale Stickstomonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOSIP	<i>eNOS Interacting Protein</i>
NOSTRIN	<i>eNOS Trafficking Inducer Protein</i>
NTP	Nukleosidtriphosphate
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff

OD	optische Dichte
P	Polyp
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PECAM	Platelet-endothelial cell adhesion molecule
PGD	Prostaglandin
PKA	Proteininase A
RBS	Rezeptorbindungsstelle
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBM	Tetramethylbenzidin
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Thr	Threonin
Th-Zelle	T-Helferzellen
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoetin</i>
Tyr	Tyrosin
VEGF	<i>vascular ednothelial growth factor</i>
WB	Wester Blotting

## **12 Danksagungen**

Mein besonderer Dank geht an Frau Professor Wollenberg für die Ermöglichung und ständige Unterstützung dieser Arbeit durch Zuspruch, Ermutigung, Lektorat und nicht zuletzt Bereitstellung der Mittel.

Herrn Dr. Ralph Pries danke ich sehr für seine enge Betreuung dieser Arbeit; seine Art, auch in Zeiten des Rückschlags stets das Positive zu sehen, haben mir geholfen diese Arbeit zu einem guten Ende zu bringen.

Herrn Dr. Michael Könnecke danke ich für seine geduldige Anleitung, fruchtbare Zusammenarbeit und sein stets offenes Ohr bei Problemen und Sackgassen.

Frau Ulrike Werner, Frau Brigitte Wollmann, Frau Kirstin Plötze-Martin und Frau Maren Drenckhan gilt ebenso mein Dank. Ob Lektorat, praktische Hilfe, neue Ideen oder persönliche Gespräche, ihre Anwesenheit hat mir die Tage im Labor leicht und unbeschwert gemacht.

Zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung, Geduld und Bedingungslosigkeit mir gegenüber.

### **13 Genehmigung der Ethikkommission**

Die Untersuchungen an menschlichen Geweben, welche für diese Dissertation durchgeführt wurden, sind von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt. Der genaue Wortlaut ist unter dem Aktenzeichen 16-278 von 17.02.2016 zu finden.

## **14 Lebenslauf**

### **Zur Person**

Geburtsdatum 09.07.1989  
Geburtsort Buxtehude



### **Studium**

Ab 2009 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
2011 Erstes Staatsexamen, Universität zu Lübeck (Note 2,0)  
2012-2013 Auslandsstudium der Humanmedizin an der Université de Caen,  
Normandie, Frankreich  
04/2015 Zweiten Staatsexamens, Universität zu Lübeck (Note 2,0)  
05/2016 Drittes Staatsexamen, Universität zu Lübeck (Note 2,0)

### **Praktisches Jahr**

05/15-05/16

1. Tertial: Klinik für HNO-Heilkunde, UKSH-Lübeck
2. Tertial: Klinik für MKG-Chirurgie und Klinik für Unfallchirurgie,  
Universitätsklinikum Leipzig
3. Tertial: Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie, Klinikum Bad  
Bramstedt und Abteilung für Onkologie und Palliativmedizin, UKSH-Lübeck

### **Zeitlicher Ablauf der Dissertation**

06/2014 bis 08/17, Unterbrechung von 9/15 bis 6/16 im Rahmen des Praktischen Jahres  
10/16-5/17: Promotionssememester

### **Beruflicher Werdegang**

ab 08/17 Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik des Krankenhauses  
Holweide in Köln

## Publikationen

### **1. Increased phosphorylation of eNOS in nasal polyps of chronic rhinosinusitis patients can be diminished by 1,8-cineol**

Michael Koennecke<sup>1</sup>, Anja Masche, Barbara Wollenberg, Frederick Benecke<sup>1</sup> Karl-Ludwig Bruchhage, Ludger Klimek, Ralph Pries, Robert Linke

Submitted 25. April 2018, in revision