

Abschlussbericht

zum von der Wissenschaftsförderung der Deutschen
Brauwirtschaft e.V. unterstützten Projekt B67:

Lässt sich einem Konsum von Bier und Bierinhaltsstoffen eine
,präbiotische' Wirkung zuordnen?

Erstellt am 29.8.2004

Antragstellerin: Prof. Dr. Christiane Bode

Mitantragsteller und Berichterstatter: PD Dr. Alexandr Parlesak

Beide: Universität Hohenheim
Institut für Biologische Chemie und
Ernährungswissenschaft
Abteilung Ernährungsphysiologie



**Adresse: Garbenstraße 28
70599 Stuttgart**

Tel.: 0711/459-2295 oder -4184

Fax: 0711/459-3947

E-mail: bodech@uni-hohenheim.de bzw. parlesak@uni-hohenheim.de

1. EINLEITUNG

1.1. Ziel der Studie

Im Rahmen des von der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. geförderten Projektes (B 67) wurden u. a. die immunmodulierenden Eigenschaften von Alkohol, Vorderwürze, Anstellwürze, Jungbier und Pils auf die Aktivierung immunkompetenter Zellen untersucht. Bier kommt in erster Linie mit Zellen in Berührung, die den Intestinaltrakt (vor allem den Darm) auskleiden (Enterozyten), die in engem Kontakt zu Zellen stehen, welche die Immunantwort vermitteln (Leukozyten). Aus diesem Grund wurden die immunmodulierenden (immunstimulierenden bzw. entzündungshemmenden) Eigenschaften von Bier und Bierinhaltsstoffen in einem Labormodell mit lebenden Zellen des Menschen (Kokulturmodell) untersucht, das der räumlichen Trennung (Kompartimentierung) des Darminhalts (Lebensmittel, bakterielle Darmflora) von den Leukozyten durch Enterozyten gerecht wird.

Bier und seine Inhaltsstoffe bzw. Vorstufen wurden unter zwei unterschiedlichen Aspekten untersucht: einerseits auf ihre Fähigkeit hin, eine Aktivierung immunkompetenter Zellen hervorzurufen und so gegebenenfalls eine Immunantwort gegen Pathogene zu unterstützen, andererseits wurden Eigenschaften untersucht, welche dazu beitragen, Entzündungsphänomene zu unterdrücken. Im ersten Fall wurde vor allem Vorstufen der Bierherstellung vor dem Würzkochen ohne den Zusatz eines die Darmflora repräsentierenden Bakterienstamms untersucht, im zweiten Ansatz vor allem Biere mit und ohne Alkohol (Ethanol) mit einem Bakterien-Referenzstamm.

Im Folgenden sind zunächst die für dieses Projekt relevanten Grundlagen mit einer kurzen Versuchsbeschreibung angegeben, gefolgt vom Ergebnisteil, der abschließend kurz gewertet wird.

1.2. Untersuchte Biere, Bierinhaltsstoffe, Vorstufen der Bierherstellung und anderer Getränke

Auf der Basis der im Rahmen des Brauprozesses anfallenden Zwischenprodukte wurden die immunmodulierenden Eigenschaften der folgenden Testlösungen in den Versuchen eingesetzt:

1. Würze ungehopft, vor dem Würzekochen (nachfolgend als Vorderwürze bezeichnet)
2. Würze gehopft, nach dem Zusatz von Hopfenextrakt (nachfolgend als Anstellwürze bezeichnet)
3. Hefesuspension (2×10^5 Zellen/Kavität – basierend auf der Hefekonzentration zu Beginn des Gärungsprozesses)

Die Komponenten Nr. 1-3 wurden im Kokulturmodell ohne gleichzeitige bakterielle Stimulation eingesetzt, um eine eventuell vorhandene immunstimulierende Wirkung messen zu können. In getrennten Ansätzen wurden außerdem mitgeführt:

4. Unstimulierte Kontrolle (= ‚Negativkontrolle‘)
5. Referenzstamm *Escherichia coli* K12 (2×10^7 Zellen/Kavität)
6. Probiotischer Bakterienstamm *Lactobacillus johnsonii* (2×10^7 Zellen/Kavität)
7. Zur Herstellung der ‚Berliner Weisse‘ verwendeter Bakterienstamm *Lactobacillus delbrückeii* (2×10^7 Zellen/Kavität)

Alle Mengenangaben bezogen sich auf ein Medium mit 20% Biergehalt.

Da aus eigenen Voruntersuchungen und Studien anderer Arbeitsgruppen bekannt war, dass Ethylalkohol eine immunsupprimierende Wirkung aufweist, wurden, um diesen Effekt nachweisen zu können, alle Untersuchungen mit ethanolischen Lösungen (u. a. Bier) und Lösungen, die dem Bier vergleichbar waren (verdünnte Weine, alkoholfreies Bier) bei gleichzeitiger bakterieller Stimulation mit dem Referenzstamm *E. coli* K12 durchgeführt. Im einzelnen wurden untersucht:

8. Ethanollösung, Endkonzentration 0,9 Vol.% (entspricht 20 Vol.% Bier mit 4,5 Vol.% Ethanol)
9. Jungbier, Pilsener Brauart, unfiltriert (20 Vol.%)
10. Pils (20 Vol.%)
11. Märzen (20 Vol.%)
12. Hefeweizen (20 Vol.%)
13. Kristallweizen (20 Vol.%)
14. Berliner Weisse (20 Vol.%)
15. Alkoholfreies Bier (20 Vol.%)
16. Malzbier (20 Vol.%)
17. Rotwein (7 Vol.% mit 0,9 Vol.% Ethanol, also identischer Ethylalkoholgehalt wie die verdünnten Biere)
18. Weißwein (7 Vol.% mit 0,9 Vol.% Ethanol).

1.3. Physiologische Grundlagen

1.3.1. Die Immunantwort in der Nähe der intestinalen Mukosa

Die Schleimhaut des menschlichen Gastrointestinaltrakts stellt eine wichtige immunologische Schaltstelle zwischen dem inneren Milieu des Körpers und seiner Umgebung dar. Daher hat die Mukosa ein komplexes, spezialisiertes Immunsystem entwickelt, welches die Fähigkeit besitzt, ständig zwischen Immunabwehr gegen pathogene Keime und Immuntoleranz gegenüber nicht-pathogenen Keimen zu unterscheiden. [Brandtzaeg et al. 1989] Es bildet den größten Teil des menschlichen Immunsystems und stellt ein geschlossenes Netzwerk aus Epithel, Geweben, immunkompetenten lymphatischen Zellen und Effektormolekülen dar [Delves et al. 1998].

Die Darmenterozyten nehmen an immunologischen Abwehrmechanismen der Schleimhaut teil, da sie beispielsweise in der Lage sind Zytokine, Arachidonsäuremetabolite und Wachstumsfaktoren zu produzieren. [Sartor 1994] Hierbei regulieren lokal produzierte Zytokine die Funktion von Epithelzellen, da

sie beispielsweise Rezeptoren für IL-1 β , GM-CSF und IL-6 exprimieren. Beim gesunden Menschen wird jedoch eine überschießende Aktivierung immunkompetenter Zellen, welche sich in großer Zahl zwischen den und unterhalb der Darmepitheleien befinden, u. a. durch die Barrieren des Mucus, der Enterozyten sowie durch erworbene Toleranz unterbunden.

Die Lamina propria (LP) ist die Region unterhalb des Darmepithels und enthält eine Vielzahl von immunkompetenten Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Plasmazellen, Mastzellen, Neutrophilen und Eosinophilen. Bei den Lymphozyten der Lamina propria (LPL) handelt es sich vorwiegend um aktivierte T-Zellen, obwohl auch einige aktivierte B-Zellen und Plasmazellen nachgewiesen werden konnten. Im Allgemeinen ist der Phänotyp von LPL vergleichbar mit dem von Zellen, die im peripheren Blut zirkulieren. In Kooperation mit einer anderen Arbeitsgruppe konnten wir eine vergleichbare Stimulierbarkeit von Zellen des peripher-venösen Blutes (PBMC) und Zellen aus der lamina propria des Menschen nachweisen [Haller et al. 2004] nachweisen.

Zytokine regulieren die Aktivierung und Unterdrückung der mukosalen Immunantwort und koordinieren Interaktionen zwischen Enterozyten und immunkompetenten Zellen.

1.3.2. Steuerung der Immunantwort durch Zytokine

Unter Zytokinen (Monokine, Lymphokine und Interleukine eingeschlossen) versteht man hormonähnliche, multifunktionelle Peptide oder Glykopeptide, die zusammen mit anderen Signalen eine Art Kommunikationsnetzwerk aufbauen, das an jeder Funktion der Immunantwort beteiligt ist. Der Begriff Zytokin kann unabhängig vom Zelltyp für jeden Mediator, der als Signal zwischen Zellen dient, verwendet werden. Sie werden lokal produziert, haben kurze Halbwertszeiten (Sekunden bis Minuten), sind in pikomolaren Konzentrationen wirksam, wirken parakrin oder autokrin und haben meistens pleiotope Wirkung, d.h. sie entfalten mehrere gleiche oder unterschiedliche Wirkungen (synergistisch/antagonistisch) auf eine oder mehrere Zellarten. Zytokine interagieren mit hochspezifischen Zellrezeptoren und induzieren zellspezifische oder allgemeine Effekte. [Gemsa et al. 1997; Kayser et al. 1998; Roitt et al, 2001] Zytokine wirken *in vivo* nicht für sich isoliert, sondern sie stellen Teilinstruktoren dar, die gemeinsam das

Verhalten der einzelnen Zellen bestimmen. Ein Teil dieses Verhaltens kann wiederum eine eigenständige Produktion von Zytokinen sein. Es ist von Bedeutung, in welcher Reihenfolge die Zellen diesen Mediatoren ausgesetzt sind. Zytokingemische haben Wirkungen, die durch ein einzelnes Zytokin allein nicht ausgelöst werden. Im gegenwärtigen Zusammenhang wird das Zytokinnetzwerk als internes Kommunikationsnetzwerk sowie als Kommunikationsnetzwerk für die Kontrolle und Interaktion mit anderen Organen verstanden. [Roitt et al. 2001]

Bezüglich ihrer Funktion können die Zytokine wie folgt zusammengefasst werden:

Proinflammatorische Zytokine: IFN- γ , IL-1, IL-8, IL-12, TNF- α

Antiinflammatorische Zytokine: IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β 1

Immunregulatorische Zytokine: IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-13, IL-15, TGF- β 1

Zu Beginn einer akuten Immunantwort werden vermehrt proinflammatorische Zytokine sezerniert, deren Konzentration im Verlauf durch die gegenregulatorische Wirkung der antiinflammatorischen Zytokine herunterreguliert wird. [Gemsä et al. 1997]. Nachfolgend sind Eigenschaften einiger wichtiger Zytokine angegeben, deren Konzentrationsbestimmung auch zur Beurteilung der durch Bier(-inhaltsstoffe) hervorgerufenen Veränderung der Immunantwort herangezogen wurde.

1.3.2.1. Tumornekrosefaktor α (TNF- α)

Überwiegend Zellen des mononukleären Phagozytensystems, Monozyten und Makrophagen, bilden TNF- α . LPS ist wahrscheinlich der stärkste Stimulus, aber auch andere bakterielle Produkte und Viren haben eine stark stimulierende Wirkung. TNF- α besitzt vielfältige biologische Eigenschaften, von denen die Entzündungsförderung die wichtigste ist. TNF- α hat entzündungsfördernde und immunregulatorische Effekte, wirkt als endogenes Pyrogen und zytotoxisch auf maligne Tumorzellen. TNF- α ist ein pluripotenter Mediator, der eine Vielzahl von Abwehrreaktionen beeinflusst. TNF- α aktiviert mononukleäre Makrophagen, steigert die Synthese von IL-1, IL-6, reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Prostaglandin E₂ (in Endothelzellen und Fibroblasten) und erhöht die Phagozytoseaktivität und die Expression der MHC I und II Moleküle. Die

Aktivierung dieser Zellen bewirkt eine effiziente Abtötung von Mikroorganismen. TNF- α bewirkt eine verzögerte Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-10), welche z. B. nach erfolgter Keimabtötung die Produktion von TNF- α herunterregulieren.

1.3.2.2. *Interleukin-8 (IL-8)*

IL-8 ist ein Chemokin und wird von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Granulozyten produziert. IL-8 aktiviert spezifisch neutrophile Granulozyten und induziert über seine chemotaktischen Eigenschaften die Anreicherung dieser Zellen am Ort der Entzündung. Es kommt zur Freisetzung von Enzymen aus den primären und sekundären Granula, zu vermehrter Bildung von Sauerstoffradikalen und verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen. IL-3 macht Basophile empfänglich für eine IL-8-induzierte Freisetzung von Histamin und Leukotrienen. IL-8 induziert weiterhin die Chemotaxis von T- und B-Lymphozyten und IL-2 aktivierten natürlichen Killerzellen. IL-8 inhibiert die durch IL-4 induzierte IgE-Synthese durch B-Lymphozyten.

1.3.2.3. *Interleukin-6 (IL-6)*

IL-6 wird hauptsächlich durch stimulierte Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen produziert. Weiterhin sind T- und B-Lymphozyten und Mastzellen in der Lage, IL-6 zu sezernieren. IL-6 induziert in der Leber die Bildung zahlreicher Proteine der Akute-Phase-Reaktion. IL-6 wirkt als Differenzierungsfaktor für B-Lymphozyten (Produktion der Immunglobuline IgM, IgG und IgA) und zusammen mit IL-1 als Koaktivator für T-Lymphozyten. In Anwesenheit von IL-2 fördert es die Differenzierung von T-Zellen in zytotoxische T-Zellen. Die Wirkung auf die B-Zellen besteht vor allem in der terminalen Differenzierung zu immunglobulinsezernierenden Plasmazellen. IL-6 ist weiterhin ein Wachstumsfaktor für Myelomzellen.

1.3.2.4. *Interleukin-10 (IL-10)*

Humanes IL-10 wird von T-Zellen (T_{H0}- und T_{H2}-Zellklonen sowie von CD8-positiven T-Zellen), Monozyten/Makrophagen und aktivierten B-Zellen

gebildet. Nach Aktivierung von T-Zellen oder Monozyten/Makrophagen wird IL-10 im Vergleich zu anderen Zytokinen relativ spät gebildet. IL-4 und IFN- γ hemmen die IL-10-Produktion, während dieses seinerseits die Produktion von IL-1 α , IL-1 β und TNF- α hemmt. Somit inhibiert IL-10 die Monozyten/Makrophagen-abhängige T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion. Es besitzt autoregulatorische Aktivität, indem es seine eigene Produktion hemmt. Es wirkt stark antiinflammatorisch, indem es die Produktion eines IL-1-Antagonisten heraufreguliert. Auch die Produktion von NO durch IFN- γ -aktivierte Makrophagen wird durch IL-10 inhibiert und es wirkt außerdem als Kostimulator für die Proliferation humaner B-Lymphozyten. Zusammengefasst erweist sich IL-10 als ein wichtiger Faktor bei der Begrenzung einer entzündlichen Reaktion.

1.3.2.5. Interferon- γ (IFN- γ)

Gamma-Interferone werden hauptsächlich nach Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen und natürlichen Killerzellen durch Antigene oder Mitogene synthetisiert. IFN- γ zeigt antivirale und antiparasitäre Aktivität und wirkt antimitotisch und antiproliferativ auf natürliche und transformierte Zellen. Bei Entzündungsprozessen ist IFN- γ ein nahezu genereller Stimulus, der all die Leukozytenfunktionen fördert, die für immunologische Abwehrmechanismen nötig sind. Bei Makrophagen ist IFN- γ das erste Signal für den Aktivierungsprozess. Typische Kennzeichen IFN- γ -aktivierter Makrophagen sind die erhöhte Bereitschaft zur TNF- α und IL-1-Produktion und zur Freisetzung von aktivierten Sauerstoffmetaboliten und Eicosanoiden [Roitt et al. 2001].

1.3.3. Das Kokulturmodell

Das Kokulturmodell ermöglicht als in vitro-Simulations-Modell der menschlichen Lamina propria die Untersuchung immunologischer Ereignisse, die durch den Kontakt von Darmenterozyten, Blutlymphozyten und dem nicht-pathogenen *Escherichia coli* K₁₂ entstehen. Somit eignet sich das Modell zur Untersuchung verschiedener Effekte, die sich bei direktem oder zeitlich verzögertem Kontakt oder räumlicher Trennung einzelner Bestandteile ergeben. Auch eignet es sich zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Substanzen (Nahrungsbestandteile,

Medikamente, endokrine Substanzen, Gallensekrete etc.) auf die Enterozyten und die Zellen der *Lamina propria* des Darmes.

Das Kokulturmodell (Abb.1) setzt sich aus der Kolonkarzinomzelllinie CaCo2, die auf einer Polyethylenterephthalat- (PET-) Membran gezüchtet wurden, aus peripher-venösen mononukleären Leukozyten (PBMC), welche aus Blut isoliert wurden und aus dem nicht-pathogenen *E. coli* K12 zusammen. Dabei simuliert die konfluente Schicht der CaCo2-Zellen die Darmoberfläche aus Enterozyten, die PBMCs ersetzen die mononukleären Zellen der Lamina propria und der *E. coli* K12 fungiert hier als Vertreter der mikrobiellen Flora des Darms [Haller et al. 2000].

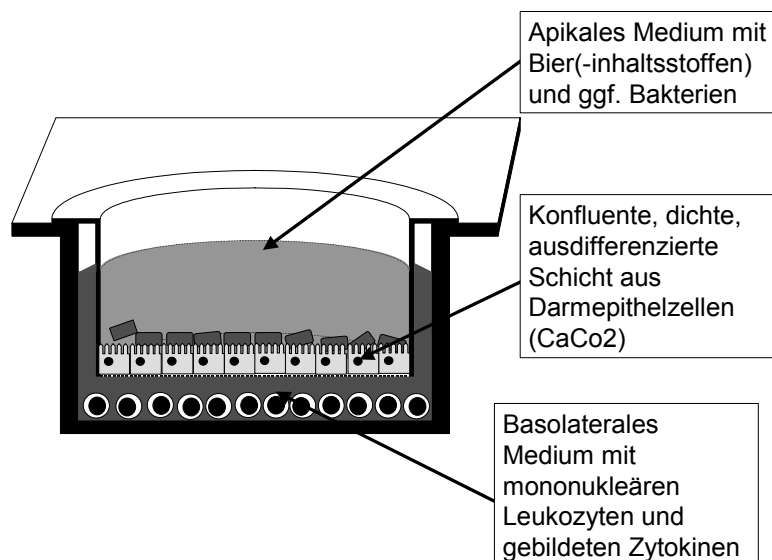


Abb. 1: Ko-Kulturmodell zur Untersuchung immunrelevanter Vorgänge an der intestinalen Oberfläche im Gastrointestinaltrakt des Menschen. In Anlehnung an anatomische Gegebenheiten trennt eine Enterozyten-ähnliche Schicht (Monolayer aus ausdifferenzierten CACO 2-Zellen) das ‚Darminnere‘ (Bakterien, ggf. mit Bier/Bierinhaltsstoffen) von den immunkompetenten Zellen (mononukleäre Leukozyten des Menschen) unter der Schleimhautoberfläche des Intestinums.

1.3.3.1. Die Zelllinie CaCo2

Bei den CaCo2-Zellen handelt es sich um eine menschliche Kolonkarzinomzelllinie, welche aus einem primären Kolonkarzinom (Adenokarzinom) eines Kaukasiers im Jahre 1974 entnommen und als permanente Zelllinie etabliert wurde. Die CaCo2-Zellen sind adhärente, epitheliale Zellen, die sich ca. alle 80 Stunden teilen. Nach vollständiger Ausdifferenzierung zeigen CaCo2-Zellen sehr ähnliche morphologische Charakteristika wie Dünndarmenterozyten. Es entsteht eine polarisierte,

einzelige Schicht von Zellen Enterozyten (Darmzellen) mit Bürstensaummikrovilli und dem aus Tight Junctions und Desmosomen gebildeten Schlussleistenkomplexes, welcher eine Abtrennung des apikalen vom basolateralen Bereich ermöglicht. Während der Polarisierungsphase kommt es zur spezifischen Expression von Lipid- und Enzymmustern an der apikalen (Bürstensaummembran) und basolateralen Membran. CaCo2-Zellen exprimieren die wichtigsten Enzyme des Medikamentenmetabolismus, verschiedene Transporter (für Glucose, Aminosäuren, Gallensäuren u.a.) und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. [Hidalgo et al. 1989]

1.3.3.2. *Escherichia coli* K12

Der nicht-pathogene, im Darm des Menschen vorkommende Bakterienstamm *E. coli* K₁₂ gehört zu der in der Humanmedizin wichtigen Bakterienfamilie der *Enterobacteriaceae*. *Enterobacteriaceae* sind gram-negative, abgerundete Ecken aufweisende, gerade Stäbchenbakterien von 0.5-1.5 µm Dicke und 2-4 µm Länge. Sie sind durch ihre peritriche Begeißelung frei beweglich, nicht sporenbildend und fakultative Anaerobier. Der natürliche Lebensraum des *E. coli* ist der Darm von Mensch und Tier. Bakterienwand: Die Wand der *Enterobacteriaceae* enthält Lipopolysaccharid (LPS), einen auch als Endotoxin bezeichneten Molekülkomplex. LPS besteht aus dem Lipoid A, dem "Core"-Komplex und der O-spezifischen Polysaccharidkette. Lipoid A, als freie Substanz oder auch eingebunden in LPS, stimuliert die Zytokinsekretion, wirkt als B-Zell-Mitogen und als immunologisches Adjuvans.

Im vorliegenden Modell wurde dieser Keim stellvertretend für die Keime des Darmlumens eingesetzt. Durch eine reproduzierbare Anzucht und Applikation des Keimes (2×10^7 Keime /mL) wurde eine reproduzierbare Stimulation der Enterozyten und Leukozyten im Kokulturmodell hervorgerufen, deren Beeinflussung durch Bier, Bierinhaltsstoffe und Biervorstufen untersucht wurde.

1.3.3.3. *Peripher-venöse mononukleäre Leukozyten (PBMC)*

McKay [1996] untersuchte frisch über einem Dichtegradienten isolierte peripher-venöse mononukleäre Leukozyten (PBMC) mittels der FACScan – Durchflusssytometrie. Die Leukozyten setzten sich zu $73 \pm 2\%$ aus

T-Zellen (CD3⁺) und zu 14 ± 1% aus Monozyten (CD14⁺) zusammen. Die verbleibenden Zellen rechnet er basierend auf Größe und Granulierung den B-Zellen zu. Die von McKay ermittelte Zellzusammensetzung ist aufgrund der Gemeinsamkeiten des Probandenpools (Alter zwischen 20 und 50) und der gleichen Methodik zur Leukozytenisolierung mit den PBMC-Isolaten dieser Arbeit vergleichbar. PBMC unterscheiden sich nur leicht von den Immunzellen der Darmschleimhaut (LPL und IEL). Die in unserer Abteilung im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit von Schramm (1999) aus Buffy Coats des Katharinenhospitals isolierten PBMCs ergaben nach Untersuchung mittels FACS eine Zellzusammensetzung gemäß Tabelle 1.

Tabelle 1: Prozentuale Zusammensetzung der im Kokulturmodell eingesetzten Leukozyten des Menschen (PBMC) [Schramm, 1999]

B-Zellen (CD19 ⁺)	8.2%
T-Zellen (CD3 ⁺)	76.6%
T-Helferzellen (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	53.3%
cyt./Suppressor-T-Zellen (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	23.4%
NK-Zellen (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	11.1%
cyt. T-Zellen (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	5.8%
aktiv. T-zellen(CD3 ⁺ HLA-DR [*])	2.2%
aktiv. T-Zellen (CD3 ⁺ DR ⁺ /CD3 ⁺)	2.8%

2. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG (METHODEN)

2.1. Kultivierung der CaCo2-Zellen

Die CaCo2-Zellen wurden zunächst in 75 cm²-Gewebekulturflaschen angereichert. In Abhängigkeit von der Einsaatdichte wuchsen die Zellen in ca. 7 Tagen zu einem konfluenten Zellrasen heran. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt und davor der Wachstumsverlauf und die Morphologie der Zellen mit Hilfe des Mikroskops kontrolliert. Die Inkubation der Zellen im Brutschrank erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 6 % CO₂.

Nach Trypsinierung und Suspension der Zellen wurde die Zellzahl nach der Methode von Neubauer in einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau angefärbt und ausgezählt. Eine Zellsuspension mit definierter Zellzahl wurde in Inserts pipettiert.

Für die Kokulturversuche wurden Membraneinsätze (Inserts) mit einer Porengröße von $0,45 \mu\text{m}$, einer Porendichte von $1,6 \times 10^6$ Poren/ cm^2 und einer Wachstumsfläche von $4,3 \text{ cm}^2$ verwendet (Abbildung 2). Die Unterseite des Inserts besteht aus einer semipermeablen Polyethylenterephthalat-(PET) Membran. Aufgrund der Lichtdurchlässigkeit des Materials konnte das Wachstum der Zellen im Lichtmikroskop beobachtet werden.

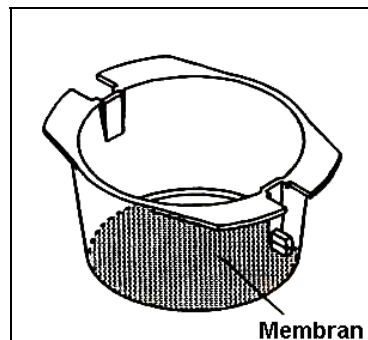


Abbildung 2: Falcon Membran-Einsatz, auf dessen Oberseite die Enterozyten angezüchtet wurden

Vor der Zugabe von 2 mL dieser Zellsuspension ($\cong 1 \times 10^6$ Zellen/Kav.) in das apikale Kompartiment (Inserts), wurde das basolaterale Kompartiment mit 2 mL Kulturmedium befüllt (Abbildung 3). Alle 2 bis 3 Tage wurde das Medium mit Hilfe einer Pasteurpipette im apikalen und basolateralen Kompartiment abgesaugt und jeweils durch 2 mL frisches Kulturmedium ersetzt. Das Zellkulturmedium war wie folgt zusammengesetzt: DMEM-Medium: 82,2%; Fötale Kälberserum (FCS): 16,4%; Aminosäuren-Stamm (NEAS): 1%; Gentamicin-Stamm und Penicillin-Streptomycin-Stamm: jeweils 0,2%.

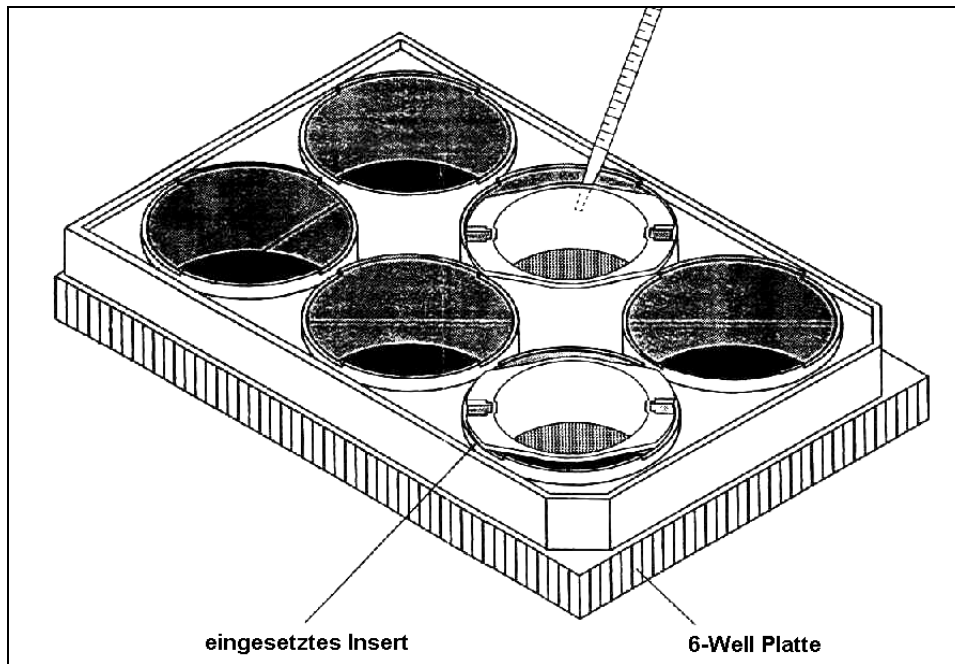


Abbildung 3: 6-Well Gewebekulturplatte mit Inserts

Die Zellen wuchsen innerhalb von ca. 5 Tagen zu einem konfluenten Zellmonolayer heran. In weiteren 10 bis 12 Tagen differenzierten die CaCo-2 Zellen vollständig aus, so das nach ca. 16 Tagen die Kokultur angesetzt werden konnte.

2.1.1. Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER) und Permeabilität der Enterozytenschicht

Zur Kontrolle der Konfluenz wurde der TEER der Enterozytenschicht gemessen. Ein hoher TEER ($>400 \Omega \times \text{cm}^2$) indiziert hierbei eine dichte Zellschicht. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Widerstandsmessgerätes (Volt-, Ohmmeter) vor und nach den Inkubationsversuchen in einer Dreifachbestimmung (siehe Abbildung 4).

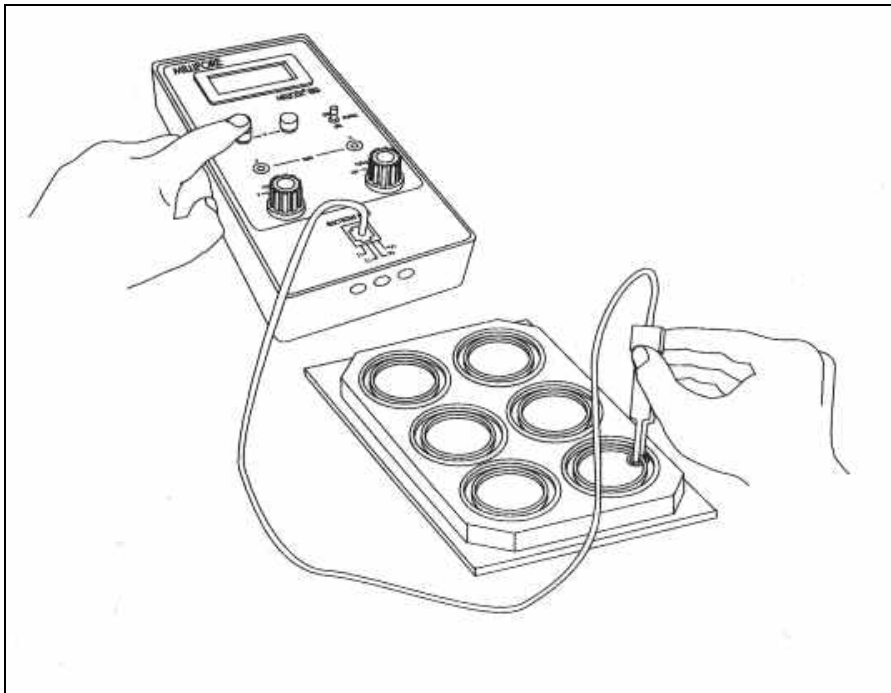


Abbildung 4 : Messung des TEER mit dem Millicell Millipore ERS (Voltmeter/Ohmmeter)

Der TEER wurde wie folgt berechnet: $TEER [\Omega \cdot cm^2] = (R_{Probe} - R_{Nullwert}) \times A$

Hierbei bedeuten: R_{Probe} : gemessener Widerstand in Inserts mit CaCo-2 Zellen;

$R_{Nullwert}$: gemessener Widerstand in Inserts ohne Zellen; A: Wachstumsfläche des Inserts (= $4,3 \text{ cm}^2$)

Zur Bestimmung des Nullwertes wurde der TEER in einer Gewebekulturplatte mit Inserts, aber ohne CaCo-2 Zellen, gemessen. Nach den Ergebnissen von Haller et al. [2000] und Schramm [1999] wurde bisher in unserer Arbeitsgruppe die Konfluenz durch Erreichen des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) von $450 \Omega \times cm^2$ ("Cutpoint") festgelegt.

Zur zusätzlichen Überprüfung der Integrität des Zellrasens wurden deshalb apikal jedem Well der Kokultur eine Lösung mit Fluorescein-markiertem Dextran (M_r 4400, 0,01 mg/mL) zugesetzt. Die Konzentration dieses Fluorescein-markierten Moleküls wurde nach Versuchsabbruch im basolateralen Zellkulturüberstand fluorimetrisch bestimmt und gab Auskunft über eine eventuelle Veränderung der Permeabilität des Monolayers. Die prozentualen Durchlässigkeiten der einzelnen Inserts wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$\%uale\ Durchlässigkeit = \frac{(M - L)}{(E \cdot \frac{1}{2})} \cdot 100$$

Hierbei bedeuten: *M* = Messwert; *L* = Leerwert (korrigierter Wert der Regressionsgleichung); *E* = höchster Eichwert

2.2. Isolierung peripher-venöser mononukleärer Zellen (PBMC)

Die peripher-venösen mononukleären Zellen (PBMCs) wurden mit Hilfe einer Dichtezentrifugation über einen Biocoll-Gradienten isoliert. Das Blut stammte von gesunden männlichen Spendern. Zur Isolation wurde mit RPMI-Medium (1640) verdünntes, mit Zellen angereichertes Blut aus Buffy-Coats (BCs) und Biocoll ($\delta = 1,077$ g/L) verwendet. Nach einer dreißigminütigen Zentrifugation bei 1400 rpm ($400 \times g$), Isolation und Waschen wurde das aus mononukleären Zellen bestehende Sediment in Inkubationsmedium aufgenommen. Die Zellzahl dieser Suspension wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die benötigte Zelldichte (2×10^6 Zellen/mL $\cong 4 \times 10^6$ Zellen/Kav.) eingestellt.

2.3. Kultivierung des *E. coli* K12

Das nicht-pathogene Gram-negative Stäbchen *Escherichia coli* K12 wurde in Luria-Broth Medium (LB-Medium: 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl ad 1000 mL H₂O deion.; pH-Wert 7,5) unter aeroben Bedingungen in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37 °C bzw. in einem 37 °C Schüttelwasserbad, gezüchtet. Am Versuchstag wurde das Bakteriensediment gewaschen und resuspendiert. Zur Einstellung der für den Versuch benötigten Bakteriendichte von 1×10^8 cfu/mL ($\cong 2 \times 10^7$ cfu/Kav.) wurde die Bakteriensuspension mit Hilfe des Photometers (Wellenlänge 600 nm) auf eine OD von 0,15 eingestellt. Erforderliche Verdünnungen erfolgten mit dem Inkubationsmedium.

2.4. Versuchsablauf und Versuchsbedingungen

Zeitlicher Verlauf der Kokulturversuche:

- Tag - 16 Aussaat von 1×10^6 CaCo2-Zellen pro Insert; Alle 2-3 Tage Medienwechsel
- Tag - 4 / - 3 Verdünnungsausstrich des *E. coli K12*; Bestimmung des TEER in allen Platten
- Tag - 1 Erste Überimpfung des *E. coli K12* in Flüssigmedium; Herstellung/Beschaffung der Versuchslösungen (Bier, Würze, verd. Alkohol, u. a.); Zweite Überimpfung des *E. coli K12* in Flüssigmedium
- Tag 0 Isolierung der PBMCs; Aufreinigung des *E. coli K12*; Herstellung der Fluorescein-Lösung; Ansetzen der Kokultur; Zugabe der *E. coli K12*-Suspension und der Versuchslösungen zum apikalen Medium
- Tag 1 bis 3 Probennahme des basalen Mediums zur Zytokinmessung den Zeitpunkten: 12h, 24h und 64h; Versuchsabbruch und Messung des TEER

Der Effekt jeder einzelnen Komponente wurde 9- bis 12mal im Doppelansatz (z. T. im Dreifachansatz) wiederholt, d. h. dass die Angaben auf Mittelwerten von mindestens neun Leukozyten-Spendern basieren.

2.5. Versuchswiederholungen und statistische Auswertung

Der erste Versuchsblock (Lösungen mit Vorstufen der Bierherstellung) und der zweite Versuchsblock wurden getrennt statistisch ausgewertet, da beide Versuchsblöcke unterschiedliche Referenzwerte als 100%-Bezüge hatten. Zur Auswertung wurde immer eine One-way-ANOVA (Varianzanalyse) mit nachgeschaltetem Post-hoc-Test (Test nach Tuckey) herangezogen. Hierbei wurden die Grundvoraussetzungen für die Anwendbarkeit dieser Tests (Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnoff, Homogenität der Varianzen Bartlett) berücksichtigt (d. h. gegebenenfalls logarhythmische Transformation der Daten).

3. ERGEBNISSE

3.1. Vorversuche: Messung der Zytokinkinetik, Bestimmung der Bedeutung der Enterozytenschicht für die Immunaktivierung und Identifizierung geeigneter Indikatoren einer Immunaktivierung

Bevor der Effekt von Bier und Bierinhaltsstoffen auf eine Aktivierung der Immunantwort im beschriebenen Modell untersucht werden konnte, wurde die Bedeutung der Enterozytenschicht für die Immunstimulation untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Die Enterozyten entzündliche Reaktionen durch die Bildung löslicher Faktoren inhibieren. Dies zeigte sich an der verminderten Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ und $IL-12$ (Abbildung 5).

(Nächste Seite:) *Abbildung 5: Konzentrationsverläufe von neun unterschiedlichen Zytokinen ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-8$, $IL-10$, $IL-6$, $TGF-\beta1$, $IL-12$, $IFN-\gamma$, und $IL-2$) während 64 h der Kokultivierung von Enterozyten (CaCo-2-Zellen), nicht-pathogenen, kommensalen Darmbakterien (*E. coli* K12) und mononucleären Leukozyten (PBMC). Die Bakterien wurde entweder dem apikalen (\square , gestrichelte Linie) oder dem basolateralen (\bullet , durchgezogene Linie) Kompartiment zugesetzt. Im dritten Experiment (\circ , gepunktete Linie) wurden nur Bakterien und PBMC kokultiviert (ohne CACO-2-Zellen).*

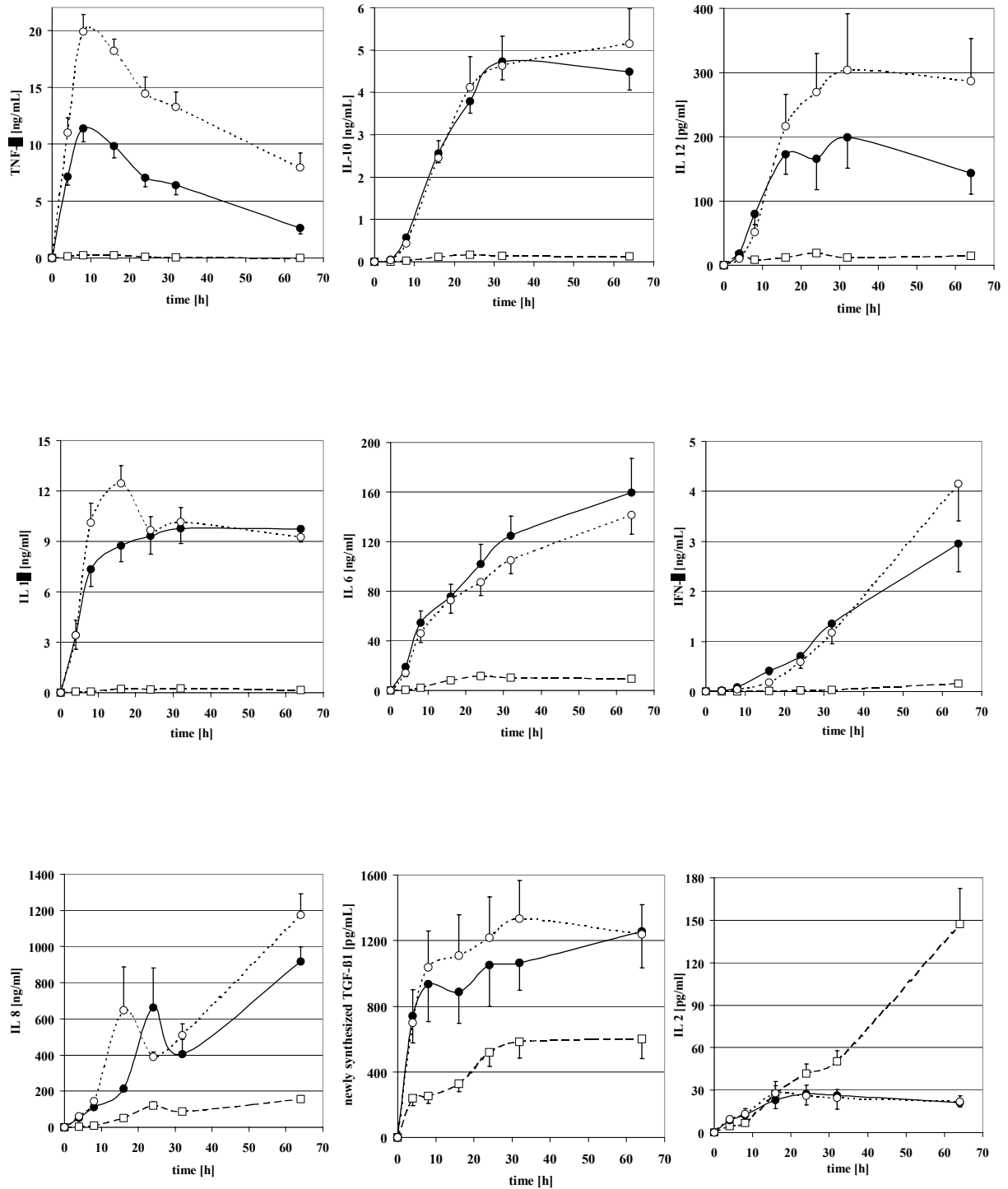


Abbildung 5

(Legende siehe bitte

vorangehende Seite)

Außerdem mussten zunächst geeignete Zytokine identifiziert werden, welche eine Immunaktivierung/-suppression durch Bier(-inhaltsstoffe) nach einer Standardstimulation repräsentieren. Hierzu wurden die Kinetiken von 9 unterschiedlichen Zytokinen im basalen Kompartiment des Kokulturmodells über 64 Stunden gemessen. Die nachfolgende Tabelle 2 gibt die Konzentrationsverläufe von neun Zytokinen [TNF- α , Interleukin(IL)-1 β , IL-8, IL-12, Interferon gamma (IFN- γ), IL-2, IL-10, IL-6, und Transforming growth factor (TGF)- β 1] im basolateralem Kompartiment wieder. Anhand dieser Ergebnisse war es möglich, markante Schlüsselzytokine, die eine Immunaktivierung repräsentieren, im verwendeten Modell zu identifizieren. Um eine valide Aussage über die Auswirkung von Bier und Bierinhaltsstoffen auf diese Aktivierung treffen zu können, wurden fünf markante Zytokine ausgewählt (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ). Die für das jeweilige Zytokin relevanten Messzeitpunkte wurde auch anhand der in der Tabelle angegebenen Werte festgelegt. Diese Ergebnisse sind bereits in einem angesehenen Fachblatt für Immunologie (*Scandinavian Journal of Immunology*) zur Publikation angenommen und befinden sich in Druck (siehe Anhang). Weitere genaue Angaben und eine Wertung dieser Zwischenergebnisse können dieser Publikation entnommen werden.

Tabelle 2 (nächste Seite): Konzentrationsverläufe von neun Zytokinen [TNF- α , Interleukin(IL)-1 β , IL-8, IL-12, Interferon gamma (IFN- γ), IL-2, IL-10, IL-6, und Transforming growth factor (TGF)- β 1] im basolateralem Kompartiment des Kokulturmodells. Der Zusatz des nicht-pathogenen Bakterienstammes führt zu einer deutlichen Erhöhung praktisch aller untersuchten Zytokine, die jedoch bei IL-2 und TGF- β am schwächsten und bei IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 und IFN- γ ausgeprägt ist.

Zytokin	Stimulation ja/nein	4 h	8 h	16 h	24 h	32 h	64 h
TNF- α [pg/ml]	NK	3 \pm 1	5 \pm 3	18 \pm 8	12 \pm 3	8 \pm 2	5 \pm 1
	<i>E. coli K12</i>	123 \pm 27	257 \pm 32	221 \pm 35	76 \pm 14	27 \pm 7	9 \pm 2
IL-1 β [pg/ml]	NK	80 \pm 17	78 \pm 12	51 \pm 14	87 \pm 23	70 \pm 7	66 \pm 8
	<i>E. coli K12</i>	62 \pm 22	63 \pm 19	230 \pm 78	206 \pm 62	259 \pm 59	158 \pm 58
IL-8 [ng/ml]	NK	0.66 \pm 0.23	1.37 \pm 0.30	8.79 \pm 4.50	3.26 \pm 0.85	3.14 \pm 0.94	4.56 \pm 0.99
	<i>E. coli K12</i>	3.20 \pm 0.80	9.23 \pm 1.73	50.1 \pm 10.8	118 \pm 27.7	86.0 \pm 13.5	157 \pm 18.7
IL-12 [pg/ml]	NK	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	<i>E. coli K12</i>	15 \pm 4	9 \pm 3	12 \pm 4	19 \pm 4	12 \pm 3	15 \pm 5
IFN- γ [pg/ml]	NK	7 \pm 3	7 \pm 3	8 \pm 2	10 \pm 1	13 \pm 3	16 \pm 4
	<i>E. coli K12</i>	5 \pm 1	5 \pm 1	12 \pm 3	20 \pm 5	31 \pm 6	156 \pm 33
IL-2 [pg/ml]	NK	20 \pm 4	22 \pm 5	32 \pm 3	41 \pm 9	46 \pm 10	98 \pm 24
	<i>E. coli K12</i>	4 \pm 1	7 \pm 2	27 \pm 5	42 \pm 6	50 \pm 8	147 \pm 25
IL-10 [pg/ml]	NK	3 \pm 1	8 \pm 2	23 \pm 13	16 \pm 5	7 \pm 2	14 \pm 4
	<i>E. coli K12</i>	6 \pm 1	27 \pm 4	119 \pm 19	164 \pm 25	139 \pm 20	129 \pm 21
IL-6 [pg/ml]	NK	25 \pm 12	16 \pm 4	11 \pm 8	81 \pm 53	12 \pm 5	22 \pm 6
	<i>E. coli K12</i>	380 \pm 103	2240 \pm 520	8210 \pm 1880	11640 \pm 2950	10520 \pm 2220	9320 \pm 2260
TGF- β 1 [pg/ml]	NK	171 \pm 53	181 \pm 64	278 \pm 62	317 \pm 81	479 \pm 107	342 \pm 114
	<i>E. coli K12</i>	237 \pm 44	254 \pm 45	329 \pm 49	520 \pm 88	582 \pm 97	600 \pm 119

3.2. Wirkung von Bier und seinen Vorstufen im Kokulturmodell

3.2.1. Wirkung von Würze, Hopfen und Hefe

Es zeigte sich, dass die (im Vergleich zu den Leukozyten empfindlicheren) CaCo2-Zellen nach 72 Stunden selbst bei Zusatz von 20 Vol.-% sterilfiltriertem Bier im Medium in ihrer Vitalität und Funktion nicht beeinträchtigt wurden.

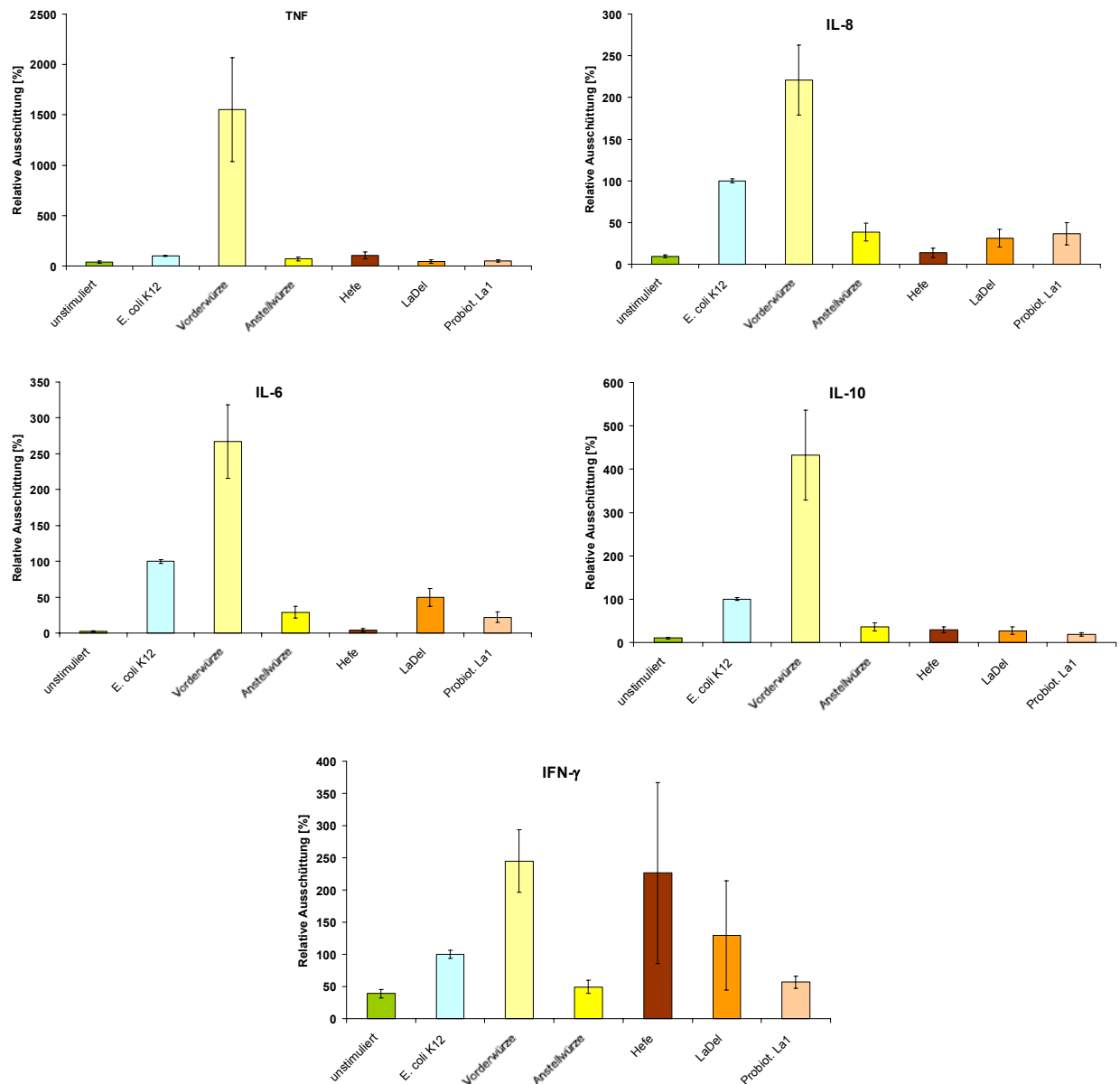


Abb. 6: Im Kokulturmodell durch unterschiedliche, zur Bierherstellung verwendete Komponenten induzierte Zytokine. Deutlich erkennbar ist das ausgeprägte immunstimulierende Potenzial der Vorderwürze, welches noch stärker als das des parallel mitgeführten nicht-pathogenen E.coli-Stamms ist. Beim Würzekochen büßt die Vorderwürze diese Fähigkeit weitgehend ein. Mittelwerte der relativen Zytokinausschüttung \pm Standardfehler. 100%: Zytokinbildung in der Negativkontrolle (nur CaCo2-Zellen und mononukleäre Leukozyten)

Bei Untersuchungen mit dem Ko-Kulturmodell ohne bakterielle Ko-Stimulation erwies sich vor allem Vorderwürze als besonders immunstimulierend (Abb. 6). Sowohl die immunaktivierenden Zytokine (TNF- α , IL-8, IFN- γ) als auch immunmodulierende (IL-6, IL-10) wurden stark induziert, sogar stärker als durch den im Ko-Kulturmodell parallelmitgeführten Referenzstamm *E. coli* K12 (Abb. 6). Bemerkenswerterweise büßte die Würze im Verlauf des Würzekochens diese Eigenschaft weitgehend ein. Der gleichfalls mitgeführte probiotische Keim *Lactobacillus johnsonii* und der bei der Herstellung von Berliner Weiße verwendete *Lactobacillus delbrueckei* besaßen kein nennenswertes Potential, eine ausgeprägte Immunantwort zu induzieren (Abb. 6), während Brauhefe in der Lage ist, im verwendeten Modell die Produktion von IFN- γ zu initiieren (Parlesak et al., Publikation in Vorbereitung).

Die Integrität der Enterozytenschicht wurde während der 64-stündigen Inkubationsdauer durch Vorderwürze und *Lactobacillus johnsonii* kaum, durch Anstellwürze und Hefe doch stark beeinträchtigt (Abb. 7). Möglicherweise sind durch die zum Ende hin nicht mehr intakte Epithelzellschicht hindurchdiffundierende Zellwandpartikel der Hefen eine Ursache für die erhöhte Ausschüttung von IFN- γ bei diesem Versuchsansatz (Abb. 7).

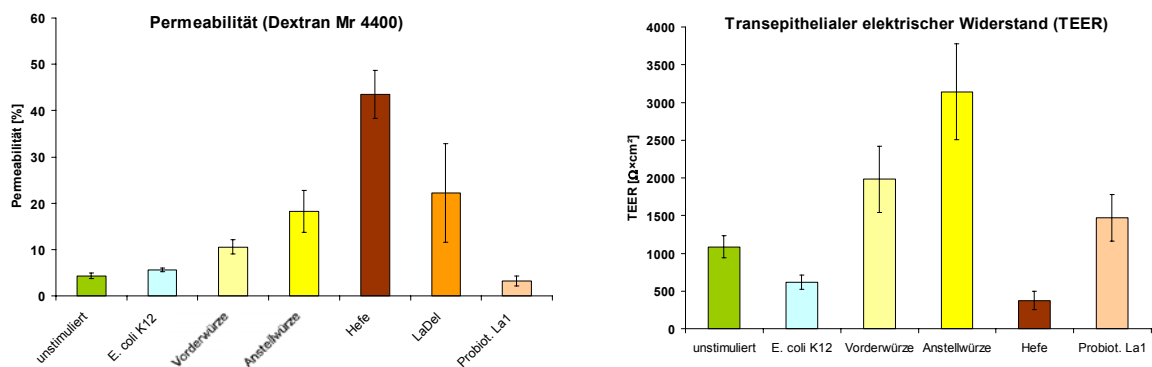


Abb. 7: Integrität der Enterozytenschicht im Ko-Kulturmodell nach Inkubation mit unterschiedlichen, zur Bierherstellung verwendeten Komponenten. Hefe schädigte während der 64-stündigen Inkubation die CaCo2-Schicht am meisten, was sich in einer erhöhten Permeabilität von Dextran Mr 4400 (linkes Diagramm) und in einem niedrigen elektrischen transepithelialen Widerstand (TEER; rechtes Diagramm) äußerte. Werte der relativen Permeabilität in Prozent und in $\Omega \times \text{cm}^2$. Mittelwerte \pm Standardfehler.

Bei Parallelinkubationen von *E. coli*, K12 mit einigen der oben erwähnten Komponenten der Bierherstellung und mit Hopfenextrakt war eine Verstärkung der *E.coli*-assoziierten Induktion der Ausschüttung von TNF- α , IL-6, IL-10 und IFN- γ durch Vorderwürze, bei TNF- α auch durch Anstellwürze und Hefe zu beobachten. Die Bildung des Interleukins IL-8 wurde nicht nennenswert beeinflusst (Abb.8) (Parlesak et al., Publikation in Vorbereitung).

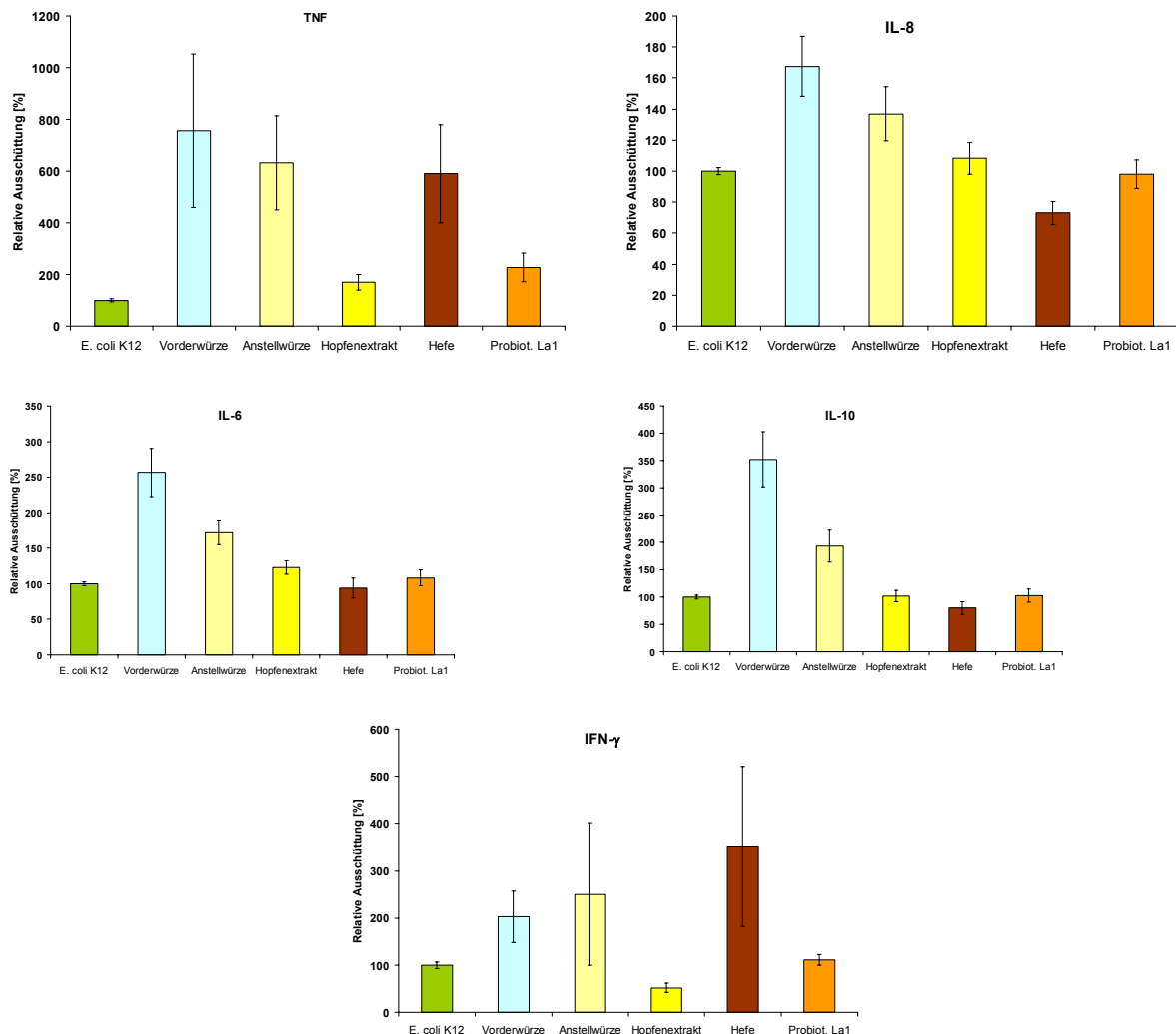


Abb. 8: Im Ko-Kulturmodell durch unterschiedliche, zur Bierherstellung verwendete Komponenten induzierte Zytokine bei Zusatz von *E. coli* K12 ($2,0 \times 10^7$ Keime/ml) zum apikalen Kompartiment. Auch hier ist das ausgeprägte immunstimulierende Potenzial der Vorderwürze deutlich erkennbar, welches beim Würzekochen nachlässt. Mittelwerte der relativen Zytokinausschüttung \pm Standardfehler. 100%: Zytokinbildung in der Positivkontrolle (apikal: *E. coli* K12 auf CaCo2-Zellen; basolateral: mononukleäre Leukozyten)

Der Zusatz von Hopfenextrakt führte zu einer deutlichen Abfall der TEER und einer signifikanten Zunahme der Permeabilität, was auf eine maßgebliche

Schädigung der Darmepithelzellen schließen lässt (Abb. 9). Eine moderate Einschränkung der Integrität der Darmepithelien war nach einem Zusatz von Anstellwürze und Hefe zu beobachten, was vor allem bei der Hefe ein Grund für die erhöhten TNF- α und IFN- γ -Werte bei diesem Ansatz sein kann (Abb. 8).

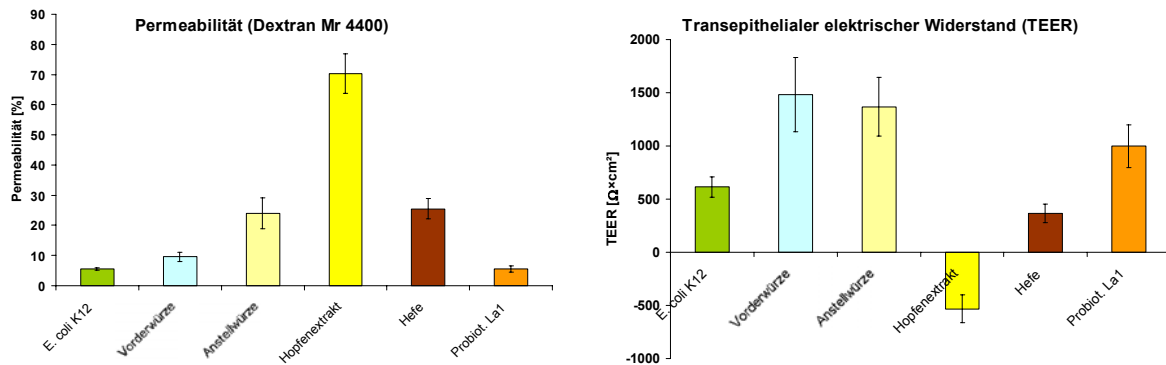


Abb. 9: Integrität der Enterozytenschicht im Ko-Kulturmodell nach Inkubation mit unterschiedlichen, zur Bierherstellung verwendeten Komponenten mit gleichzeitigem Zusatz von *E. coli* K12 ($2,0 \times 10^7$ Keime/ml) zum apikalen Kompartiment. Hopfenextrakt und – in geringerem Ausmaß – Anstellwürze und Hefe beeinträchtigten während der 64-stündigen Inkubation die CaCo2-Schicht, was sich in einer erhöhten Permeabilität von Dextran Mr 4400 (linkes Diagramm) und in einem niedrigen elektrischen transepithelialen Widerstand (TEER; rechtes Diagramm) äußerte. Werte der relativen Permeabilität in Prozent und in $\Omega \times \text{cm}^2$. Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.2.2. Wirkung von Bier, alkoholfreiem Bier, Malzbier, Berliner Weiße und Wein

Während der Zusatz von unterschiedlichen Getränken (Biersorten: 20 Vol.-%; Ethanol: 0,9 Vol.-%, entsprechend dem Alkoholgehalt des Bieres; Wein: 6,4 Vol.-% mit 0,9 Vol.-% Ethanol Endkonzentration) die Produktion der Zytokine IL-8 und IL-10 nicht nennenswert beeinflusste, senkten vor allem alkoholhaltige Getränke die Produktion von TNF- α , IL-10 und IFN- γ z. T. erheblich (Abb. 10). Alkoholfreies Bier und Malzbier veränderten keine der gemessenen Zytokinausschüttungen. Die stärkste Inhibition der Zytokinsynthese wiesen Berliner Weiße, Rotwein und Weißwein auf.

Bemerkenswert sind auch die unterschiedlichen Ausschüttungen von IFN- γ . Stärker gehopftes Bier hemmte die IFN- γ -Synthese signifikant weniger als schwach gehopfte Biere mit Alkohol (Abb. 10) (Parlesak et al., Publikation in Vorbereitung).

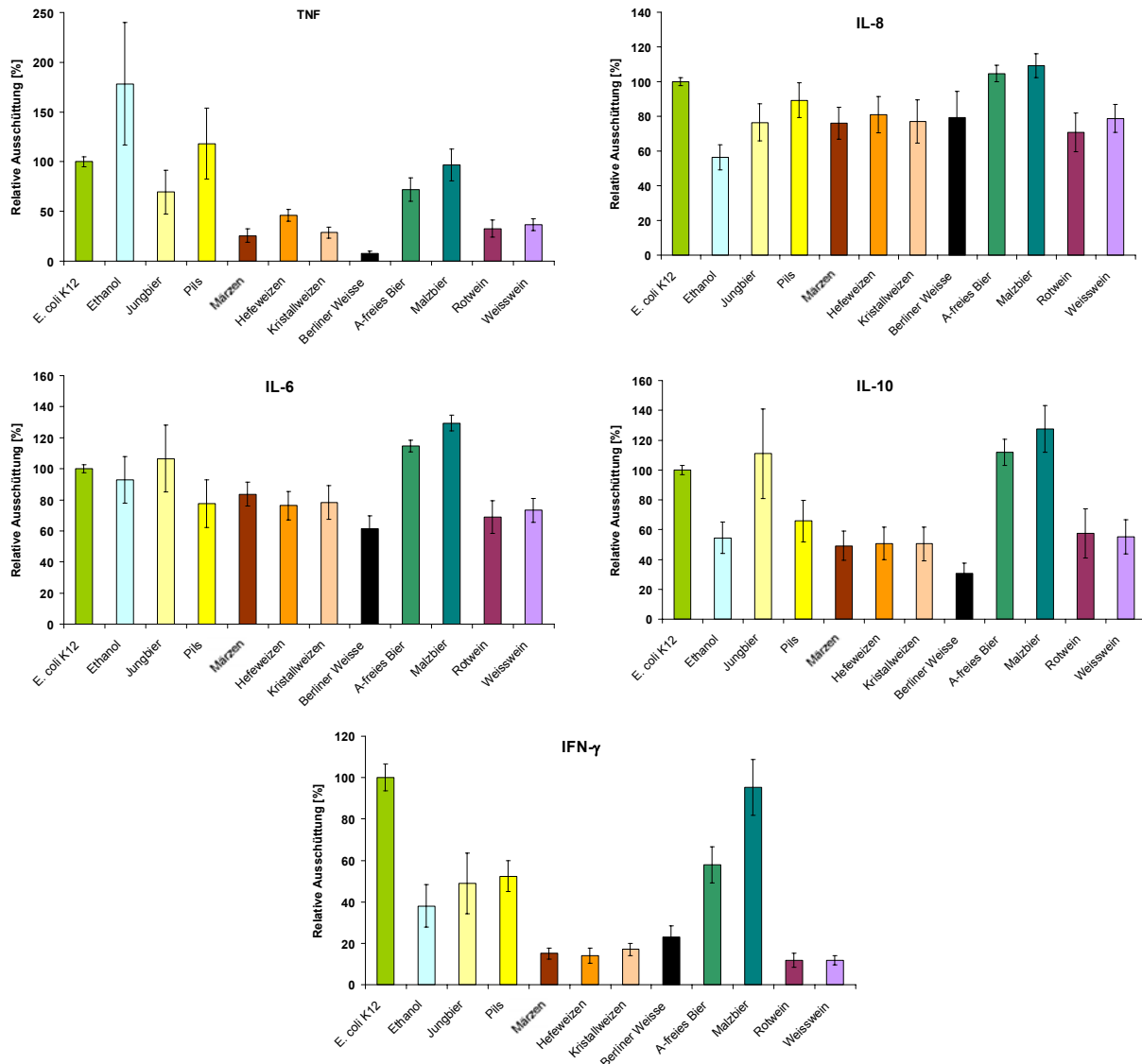


Abb. 10: Im Ko-Kulturmodell durch unterschiedliche Getränke bzw. Vorstufen von der Bierherstellung induzierte Zytokinbildung bei Zusatz von *E. coli* K12 ($2,0 \times 10^7$ Keime/ml) zum apikalen Kompartiment. Tendenziell führten alkoholhaltige Getränke zu einer Reduktion der Ausschüttung von sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Zytokinen. Diese Hemmung war bei IFN- γ besonders ausgeprägt. Mittelwerte der relativen Zytokinausschüttung \pm Standardfehler. 100%: Zytokinbildung in der Positivkontrolle (apikal: *E. coli* K12 auf CaCo2-Zellen; basolateral: mononukleäre Leukozyten)

Alle untersuchten Getränke, die entweder 20 Vol.-% des Mediums ausmachten oder auf den gleichen Alkoholgehalt wie die Ansätze mit Bier eingestellt wurden (Weiß- und Rotwein), beeinträchtigten die Integrität der Darmenterozyten mit einer Ausnahme praktisch überhaupt nicht (Abb. 11). Nur Jungbier führte zu einer Erhöhung der Permeabilität des verwendeten Markers (Fluorescein-Dextran M_r 4400) und zu einem Absinken des TEER.

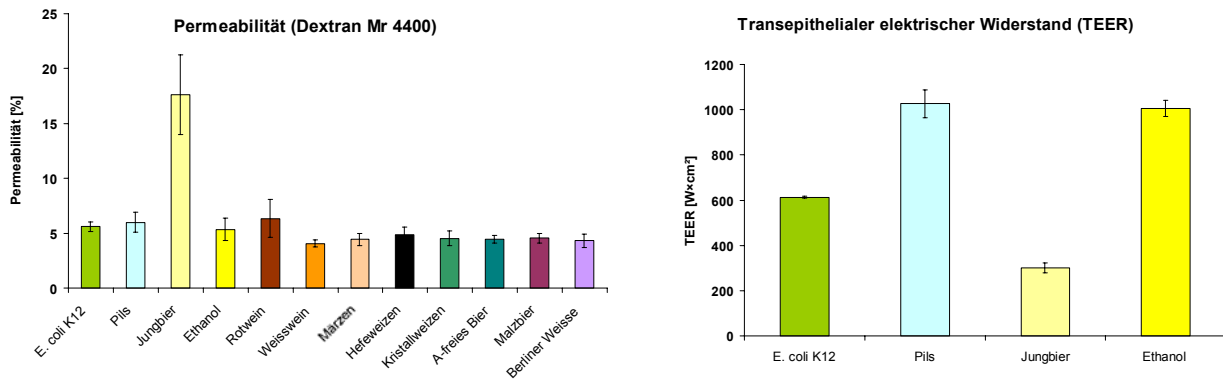


Abb. 11: Integrität der Enterozytenschicht im Ko-Kulturmodell nach Inkubation mit unterschiedlichen Getränken bzw. Vorstufen der Bierherstellung in Gegenwart von *E. coli* K12 ($2,0 \times 10^7$ Keime/ml) zum apikalen Kompartiment.. Von den untersuchten Getränken führte nur der Zusatz von Jungbier während der 64-stündigen Inkubation zu einer Integritätseinschränkung der CaCo2-Schicht, was sich in einer erhöhten Permeabilität von Dextran Mr 4400 (linkes Diagramm) und in einem niedrigen elektrischen transepithelialen Widerstand (TEER; rechtes Diagramm) äußerte. Werte der relativen Permeabilität in Prozent und in $\Omega \times \text{cm}^2$. Mittelwerte \pm Standardfehler.

4. BEWERTUNG DER ERGEBNISSE (DISKUSSION)

Zusammenfassend kann man sagen, dass nach den vorliegenden Ergebnissen Vorderwürze eine stark immunstimulierend wirkt und dass bei stark gehopftem Bier (Pils) die alkoholbedingte Hemmung der Immunantwort durch nicht-alkoholische Begleitstoffe reduziert wird. Da alle Experimente mit humanen Zellen durchgeführt wurden, ist eine Analogie der Beobachtungen im Darm des Menschen sehr wahrscheinlich.

Die in der Arbeitsgruppe von Szabo [Mandrekar et al., 1997; Szabo et al 1996] gemachten Beobachtungen über eine immunsupprimierende Wirkung des Ethylalkohols wurden durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt und auch für die Interaktion zwischen Darmbakterien, Enterozyten und Leukozyten des Menschen erweitert.

Dass Phytochemikalien wie Flavonoide und Carotinoide immunmodulierende Eigenschaften aufweisen können, wird schon länger auf der Basis epidemiologischer Studien vermutet, die aufgrund von Datenerhebungen zu Ernährungsgewohnheiten eine geringere Inzidenz bestimmter Krankheiten postulierten [Schmitz und Chevaux]. Die Forschung konzentrierte sich hierbei verstärkt auf die potentiellen antioxidativen Einflüsse, die Reinstoffe pflanzlicher Herkunft (z.B. Xanthohumol, Quercetin etc.) auf isolierte Enzymsysteme ausüben können. Zunehmend wendet sich die experimentelle Forschung auch der

Untersuchung möglicher Einflüsse dieser Verbindungen auf isolierte immunkompetente Zellen bzw. Zelllinien zu. Quercetin ist – neben Xanthohumol – eines der häufigsten Flavonoide im Bier (bis zu 20 mg/l) [Piendl 1999]. Den Arbeitsgruppen um Wadsworth und Wei war es möglich, nachzuweisen, dass Quercetin in LPS-stimulierten murinen Makrophagen zu einer Hemmung der TNF- α [Wadsworth et al. 2001; Wei et al. 2001] und IL-6-Expression führt [Xagorari et al. 2001]. Weiterhin hemmt Quercetin in menschlichen Synovialzellen die TNF- α -vermittelte Stimulation der IL-8 und MCP-1 Expression [Sato et al. 1997]. Allerdings sind die *in vitro* nachgewiesenen anti-inflammatorischen Effekte von phenolischen Komponenten auf Makrophagen bzw. Zelllinien durch Wirkkonzentrationen induziert werden, wie sie unter physiologischen Bedingungen im Blut nicht anzutreffen sind [Crouvezier et al. 2001]. Im Unterschied hierzu sind bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modell die Enterozyten Konzentrationen der Probelösungen ausgesetzt, wie sie vergleichbar mit den physiologischen Gegebenheiten des Organismus vorzufinden sein dürften.

Es gibt keine verfügbare Literatur, die darauf hindeutet, dass komplexe, natürlich vorkommende Substanzgemische (wie sie im Rahmen dieser Arbeit in Form von bei der Bierherstellung benötigten bzw. anfallenden komplexen Ausgangs- und Zwischenprodukten eingesetzt wurden, wie z.B. Würze) in einem *in vitro* Modell der *Lamina propria* bezüglich immunmodulatorischer Eigenschaften untersucht wurden. Mit dieser Arbeit konnte demnach ein wichtiger Grundstock für weitere Untersuchungen zu diesem Thema gelegt werden.

Bemerkenswert ist der Umstand, dass die Vorderwürze durch das Würzekochen ihre Fähigkeit einbüßt, im Kokulturmodell eine Immunstimulation hervorzurufen. Dies deutet darauf hin, dass immunologisch wirksame Substanzen durch den Erhitzungsprozess inaktiviert werden. Dies kann z. B. durch Denaturierung von Proteinen, thermische Spaltung oder Reaktion mit anderen Komponenten bedingt sein. Diese Erkenntnisse können jedoch eine Grundlage dafür liefern, Getränke auf Cerealienbasis herzustellen, welche die Immunantwort im Sinne einer Immunaktivierung beeinflussen können. Auch andere, nicht-alkoholische Inhaltsstoffe beeinflussen nach den vorliegenden Ergebnissen die Aktivierung immunkompetenter Zellen. Eine gründliche wissenschaftliche Charakterisierung dieser Inhaltsstoffe hinsichtlich ihrer immunmodulierenden Wirkung führt mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl zum besseren Verständnis der (immun-)physio-

logischen Wirkung von Bier als auch zu einer vergrößerten Akzeptanz dieses Getränkes außerhalb wissenschaftlicher Fachkreise.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Brandtzaeg P, Halstensen T S, Kett K, Krajči P, Kvale D, Rognum T O, Scott H, Sollid L M. Immunobiology and Immunopathology of Human Gut Mucosa: Humoral Immunity and Intraepithelial Lymphocytes. *Gastroenterology* 1989; 97:1562-84
2. Crouvezier S., Powell B., Keir D., Yaqoob P. The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leucocytes in vitro. *Cytokine* 2001; 13: 280-6
3. Delves P J, Roitt I M. *Encyclopedia of Immunology Second Edition*. London: Academic Press Limited 1998
4. Gemsa D, Kalden J R, Resch K. *Immunologie*. 4. Auflage. New York, Stuttgart: Thieme 1997
5. Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 2000;47:79-87.
6. Haller D, Holt L, Parlesak A, Zanga J, Bauerlein A, Sartor RB, Jobin C. Differential effect of immune cells on non-pathogenic Gram-negative bacteria-induced nuclear factor-kappaB activation and pro-inflammatory gene expression in intestinal epithelial cells. *Immunology* 2004;112:310-20.
7. Hidalgo I J, Raub T J, Borchardt R T. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (CaCo-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterology* 1989;96:736-49
8. Kayser F H, Bienz K A, Eckert J, Zinkernagel R M. *Medizinische Mikrobiologie*. 9.Auflage. Stuttgart, New York: Thieme 1998
9. McKay D M, Croitoru K, Perdue M H. T cell-monocyte interactions regulate epithelial physiology in a coculture model of inflammation. *Am. J. Physiol.* 1996; 270:C418-28
10. Parlesak A, Haller D, Brinz S, Bäuerlein A, Bode C: Modulation of cytokine release by differentiated CACO-2 cells in a compartmentalized co-culture model with mononuclear leukocytes and non-pathogenic bacteria. *Scand J Immunol*: im Druck
11. Roitt IM, Delves PJ. *Roitt's Essential Immunology*. Blackwell Science Ltd. 2001.
12. Sartor R B. Cytokines in Intestinal Inflammation: Pathophysiological and Clinical Considerations. *Gastroenterology* 1994; 106:533-539
13. Sato M., Miyazaki T., Kambe F., Maeda K., Seo H. Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the induction of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured human dynovial cells. *J. Rheumatol* 1997;24: 1680-4
14. Schmitz H., Chevaux K. Defining the role of dietary phytochemicals in modulating human immune function. In: *Nutrition and Immunology*; Gershwin et al. (eds.). Totowa: Humana Press; 1996; 107-119
15. Schramm A. Einfluß von Alkohol und Sojalecithin auf die Immunantwort in einem Darm-Kokulturmodell.: Diplomarbeit Universität Hohenheim, Stuttgart, 1999; Betreuer: Prof. Dr. Ch. Bode

16. Szabo G, Mandrekar P, Girouard L, Catalano D. Regulation of human functions by acute ethanol treatment: decreased tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and elevated interleukin-10, and transforming growth factor-beta production. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20:900-7
17. Wadsworth TL, MacDonald TL, Koop DR. Effects of Ginkgo biloba extract and quercetin on lipopolysaccharide-induced signalling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. Pharmacol.* 2001; 62: 963-74
18. Wei BL, Lu, CM, Tsao LT, Wang JP, Lin CN. In vitro anti-inflammatory effects of quercetin 3-O-methyl ether and other constituents from Rhamnus species. *Planta Med.* 2001; 67:745-7
19. Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 296: 181-7