

Aus der
Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin

**Die protektive Wirkung der CXCR4- und CXCR7 -
Inhibition hängt in der akuten pulmonalen Inflammation
vom A_{2B} Adenosinrezeptor ab**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Meißner, Nadine Sylvina

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Reutershan
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Lescan

Tag der Disputation: 14.06.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Akutes Lungenversagen	6
1.1.1. Definition Acute Lung Injury und Acute Respiratory Distress Syndrome	6
1.1.2. Ätiologie	7
1.1.3. Epidemiologie und Outcome	8
1.1.4. Aufbau der Alveolen und der alveolokapillären Membran	10
1.1.5. Pathophysiologie	12
1.1.6. Therapie	13
1.2. Lipopolysaccharid und ARDS	14
1.3. Neutrophile Granulozyten und deren Migration in die Lunge	16
1.4. Reaktive Sauerstoffspezies und Respiratory Burst	19
1.5. Zytokine	20
1.5.1. Interleukin-1	20
1.5.2. Tumornekrosefaktor- α	21
1.5.3. Interleukin-6	22
1.6. Chemokine	23
1.6.1. Interleukin-8	23
1.6.2. Stromal cell-derived factor-1/ CXCL12 und seine Rezeptoren	24
1.7. Adenosin in der akuten pulmonalen Inflammation	26
1.8. CXC Rezeptor4-Inhibitor, AMD3100	31
1.9. CXC Rezeptor7-Inhibitor, CCX771	31
1.10. Fragestellung	32
2. Material und Methoden	33
2.1. Materialien	33
2.1.1. Verbrauchsmaterialien	33
2.1.2. Geräte	36
2.1.3. Chemikalien, Medien	37
2.1.4. Antikörper, Enzyme	39

2.1.5. Medikamente	40
2.1.6. Software, Statistik	40
2.1.7. Versuchstiere	41
2.2. Methoden	42
2.2.1. Induktion der pulmonalen Inflammation- Verneblung von LPS	42
2.2.2. Behandlung mit AMD3100 (CXCR4-Inhibitor)	43
2.2.3. Behandlung mit CCX771 (CXCR7-Inhibitor)	43
2.2.4. Anästhesie	44
2.2.5. Migration Neutrophiler Granulozyten in vivo	44
2.2.6. Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität mittels Evans Blue	51
2.2.7. ELISA	54
2.2.8. Immunhistochemie	56
2.2.9. Statistische Auswertung	60
3. Ergebnisse	61
3.1. Migration Neutrophiler Granulozyten in vivo	61
3.1.1 Dosisermittlung AMD3100 (CXCR4-Inhibitor)	61
3.1.2 CXCR4-Inhibition zu unterschiedlichen Zeitpunkten	63
3.1.3 CXCR7-Inhibition zu unterschiedlichen Zeitpunkten	65
3.1.4 Migration Neutrophiler Granulozyten nach der CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C ₅₇ Bl/6	67
3.1.5 Migration Neutrophiler Granulozyten nach der CXCR4- und CXCR7-Inhibition in A _{2B} AR ^{-/-} - Mäusen	73
3.2. Bestimmung der Mikrovaskulären Permeabilität mittels Evans Blue	77
3.2.1 Mikrovaskuläre Permeabilität in Wildtyp Mäusen C ₅₇ Bl/6	78
3.2.2 Mikrovaskuläre Permeabilität in A _{2B} AR ^{-/-} - Mäusen	81
3.3. Bestimmung der Zytokinkonzentration	83
3.3.1 Zytokinkonzentration nach CXCR4- und CXCR7- Inhibition in Wildtyp Mäusen C ₅₇ Bl/6	83

3.3.2 Zytokinkonzentration nach CXCR4- und CXCR7- Inhibition in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen	85
3.4. PMN-Infiltration der Lunge im histologischen Bild	87
3.4.1 PMN-Infiltration der Lunge nach CXCR4- und CXCR7- Inhibition in Wildtyp Mäusen C ₅₇ Bl/6	87
3.4.2 PMN-Infiltration der Lunge nach CXCR4- und CXCR7- Inhibition in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen	89
4. Diskussion	91
5. Zusammenfassung	104
6. Abkürzungsverzeichnis	105
7. Abbildungsverzeichnis	109
8. Tabellenverzeichnis	111
9. Literaturverzeichnis	112
10. Erklärung zum Eigenanteil	122
11. Veröffentlichung	123
12. Danksagung	124

1. Einleitung

1.1 Akutes Lungenversagen

1.1.1 Definition Acute Lung Injury und Acute Respiratory Distress Syndrome

Das Acute Lung Injury (ALI) und das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) sind Syndrome des akuten Lungenversagens bei zuvor lungengesunden Patienten. Die beiden Syndrome sind gekennzeichnet durch eine diffuse pulmonale Inflammation. Hierbei kommt es zu einer Erhöhung der pulmonalen Kapillarpermeabilität, was ein Lungenödem und eine daraus resultierende Oxygenierungsstörung des Blutes mit einer Hypoxämie zur Folge hat. Eine kardiologische Ursache muss ausgeschlossen werden [1].

Das ARDS wurde erstmalig im Jahr 1967 von Ashbaugh et al. beschrieben. Es ist unter anderem durch einen akuten Beginn gekennzeichnet und geht mit einer plötzlich erhöhten Atemfrequenz (Tachypnoe), einem verminderten Sauerstoffgehalt im Blut (Hypoxämie) und einem Verlust der Lungendehnbarkeit (Compliance) einher [2]. Neben den akut einsetzenden Symptomen, wurden u.a. noch röntgenologisch bilaterale diffuse Lungeninfiltrate, eine mikroskopisch nachweisbare Hämorrhagie, Lungenödem und hyaline Membranen im Lungengewebe beschrieben [2].

1992 wurden durch die American-European Consensus Conference zwei Syndrome definiert. ARDS und ALI, welches als mildere Form eines akuten Lungenversagens definiert wurde. Als Kriterien wurden ein akuter Beginn, bilaterale Lungeninfiltrate im Röntgen - Thorax und ein pulmonalarterieller Verschlussdruck (Paw) ≤ 18 mmHg ohne Anhalt für ein Linksherzversagen festgelegt [1]. Unterschieden wurden beide Formen lediglich anhand des Oxygenierungsindex. Der Oxygenierungsindex wird auch Horovitz-Index genannt und ist der Quotient aus dem arteriellen Sauerstoffpartialdruck (PaO₂) und der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO₂).

Bei ALI, der milderen Form des akuten Lungenversagens beträgt dieser ≤ 300 mmHg, bei ARDS ≤ 200 mmHg [1]. Diese relativ groben Kriterien wurden im Jahr 2012 in der Berlin-Definition neu modifiziert. Im Hinblick auf die Oxygenierung kommt in der Berlin - Definition nicht mehr die Einteilung ALI und ARDS zum Einsatz, sondern es erfolgt eine Unterteilung in Oxygenierungsgrade in Abhängigkeit vom Positive End Expiratory Pressure (PEEP) in eine milde, eine moderate und eine schwere Form [3]. Die milde Form wird mit einem Oxygenierungsindex von $200 < PaO_2/ FiO_2 \leq 300$ mmHg mit einem PEEP/ CPAP ≥ 5 cmH₂O beschrieben, die moderate Form mit $100 < PaO_2/ FiO_2 \leq 200$ mmHg und mit einem PEEP ≥ 5 cmH₂O. Ein Horowitz - Index von $PaO_2/ FiO_2 \leq 100$ mmHg mit einem PEEP ≥ 5 cmH₂O beschreibt die schwere Form des ARDS [3]. Zudem beschreibt die Berlin - Definition noch folgende Kriterien: einen akuten Beginn innerhalb von 7 Tagen, bilaterale Lungeninfiltrate im Röntgen - Thorax oder in der Computer Tomographie (CT) und ein nicht - kardiales Lungenödem. Um eine kardiale Ursache auszuschließen, wird zum Beispiel eine Echokardiographie empfohlen [3].

1.1.2 Ätiologie

Die verschiedenen Risikofaktoren, welche ein akutes Lungenversagen auslösen können, werden in zwei Gruppen eingeteilt: direkte (pulmonale) und indirekte (extrapulmonale) Faktoren [1]. Die direkten Auslöser verursachen eine direkte Schädigung des Lungengewebes, z. B. die Aspiration von Magensaft. Die indirekten Auslöser schädigen die Lunge mittels einer systemisch-hämatogenen Entzündungsreaktion, z. B. im Rahmen einer Blutvergiftung (Sepsis). Direkte Risikofaktoren sind häufiger für die Entstehung des akuten Lungenversagens verantwortlich als indirekte (57% vs. 45%) [4, 5]. Die Pneumonie (28%) und die Aspiration (18%) sind die häufigsten direkten Risikofaktoren. Die Sepsis stellt mit 34% den häufigsten indirekten Risikofaktor dar [4]. Relevante Auslöser sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Tabelle 1.1: Risikofaktoren, welche die Entstehung eines akuten Lungenversagens begünstigen [1, 6, 7]

Direkte (pulmonale) Risikofaktoren	Indirekte (extrapulmonale) Risikofaktoren
Pneumonie	Sepsis
Aspiration	Polytrauma
Beinahe-Ertrinken	Nicht-kardiogener Schock
Inhalation giftiger Gase/	Massentransfusion
Inhalationstrauma	Kardiopulmonaler Bypass
Lungenkontusion	Akute Pankreatitis
	Verbrennungen
	Schädel-Hirn-Verletzungen

1.1.3 Epidemiologie und Outcome

Die Inzidenz und die Mortalität wird in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Zahlen angegeben. In Studien, welche in den Vereinigten Staaten, Australien und in Europa durchgeführt wurden, bezieht sich die ARDS-Diagnostik auf die einheitlichen AECC-Kriterien. Ältere Studien, welche vor der Einführung der AECC-Kriterien durchgeführt worden sind, werden im Folgenden nicht berücksichtigt.

Die Zahlen für die Inzidenzen des ALI und der ARDS schwanken zwischen den einzelnen Autoren. Bei Rubenfeld et al. liegt die ALI-Inzidenz bei 78,9 Fälle und die ARDS-Inzidenz bei 58,7 Fälle auf 100.000 Einwohner pro Jahr [5]. In einer anderen amerikanischen Studie, beläuft sich die ARDS-Inzidenz auf 15,3 Fälle [8]. Die Inzidenz in Australien liegt bei 34 Fällen (ALI) und 28 Fälle (ARDS) auf 100.000 Einwohner pro Jahr [4]. In Europa wird die ALI-Inzidenz mit 10,6 Fällen [9], 17,9 [10] und mit 29,3 Fällen [11] auf 100.000 Einwohner pro Jahr angegeben. Die Inzidenz für ARDS liegt bei 5,0 Fällen [9], 13,5 [10] und 24,0 Fällen [11] auf 100.000 Einwohner pro Jahr. Vergleichbar ist auch die für

Schottland angegebene Inzidenz mit 15,0 Fällen auf 100.000 Einwohner pro Jahr [12].

Die Mortalität des ARDS liegt in den amerikanischen Studien bei 41,1% [5] und bei 47% [8]. Im Vergleich dazu, liegt sie in der australischen Studie von Bersten et al. bei 34% [4] und in den europäischen Studien bei 37,8% [13], 41,2% [10] und 47% [9]. In Schottland liegt die Mortalität des ARDS sogar bei 60,9% [12] und in Argentinien bei 58% [14]. Die Mortalität des ALI liegt in den Vereinigten Staaten bei 38,5% [5] und in Australien bei 32% [4]. In Europa liegt sie bei 42,2% [10] und 21% [13].

Warum die Inzidenz in den Vereinigten Staaten höher ist als in Australien und Europa, ist noch ungeklärt. Ob die Herkunft der Patienten oder die Genetik die Inzidenz beeinflussen, ist noch ungewiss. Es fällt auf, dass die Inzidenz beim männlichen Geschlecht höher ist als beim Weiblichen [8, 15-18]. Das Risiko ein akutes Lungenversagen zu entwickeln, die Mortalität und das Outcome sind vom individuellen Risikoprofil und von vorhandenen Komorbiditäten abhängig. So entwickeln Patienten mit fortgeschrittenem Alter häufiger ein ARDS als Jüngere [13, 15]. Auch nierentransplantierte Patienten unter immunsuppressiver Therapie oder mit einer Abstoßungsreaktion, haben ein erhöhtes Risiko, ein akutes Lungenversagen zu entwickeln [19]. Während sich das ARDS-Risiko durch Rauchen [15] und durch chronischen Alkoholabusus [11] erhöht, wird es durch das Vorhandensein von Diabetes mellitus nicht erhöht [20].

Die ARDS-Mortalität ist in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten deutlich gesunken, wozu nicht zuletzt der intensivmedizinische Fortschritt und die Verbesserung der ALI- und ARDS-spezifischen Behandlung einen Großteil beigetragen haben [18, 21]. Dieser Rückgang der ARDS-Mortalität lässt sich v.a. bei Trauma- und chirurgischen Patienten verzeichnen. Prädiktoren, v.a. Sepsis, Multi-Organ-Versagen, fortgeschrittenes Alter, Immunsuppression und ein niedriger Horowitz-Index, sind auch heutzutage noch mit einer sehr hohen ARDS-Mortalität verbunden. Auch ein benötigtes hohes Tidalvolumen bei der

mechanischen Beatmung ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert [13, 18, 22, 23].

Die Mehrheit der ARDS-Überlebenden erlangen innerhalb eines Jahres eine normale Lungenfunktion zurück. Die verbleibenden Patienten zeigen Veränderungen wie z.B. eine Fibrose oder pulmonale Zysten. Fast die Hälfte der Patienten ist nach 12 Monaten bereits wieder arbeitsfähig. Die andere Hälfte schafft die Wiedereingliederung in das Berufsleben nicht, aufgrund schneller körperlicher Ermüdung und Muskelschwäche [24]. Zusätzlich treten bei einem Großteil der ARDS-Überlebenden neurokognitive Folgeerkrankungen auf. Die Patienten berichten über moderate bis schwere Depressionen, Angstzustände und einer verminderten Lebensqualität [25].

1.1.4 Aufbau der Alveolen und der alveolokapillären Membran

Die Hauptaufgabe der Lunge ist die Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff (Oxygenierung) und die Abatmung von Kohlendioxid. Hierfür muss eine Belüftung der Alveolen (Ventilation) und eine Perfusion der Lungengefäße stattfinden. Zudem erfordert der Gasaustausch eine Diffusion von Sauerstoff und Kohlendioxid über die Blut-Luft-Schranke. Die sehr dünne Blut-Luft-Schranke, auch alveolokapilläre Membran genannt, setzt sich zusammen aus den alveolären Pneumozyten Typ-I, den kapillaren Endothelzellen und der dazwischenliegenden dünnen Basalmembran. Über diese drei Bestandteile findet die Diffusion von Sauerstoff und Kohlendioxid statt.

Die alveoläre Epithelschicht besteht aus den Pneumozyten Typ-I und den Pneumozyten Typ-II. Die Pneumozyten Typ-I sind dünne und schmale Zellen, welche die Oberfläche der Alveole zu etwa 90% auskleiden. Die Typ-I-Zellen sind Bestandteil der alveolokapillären Membran und sind am Gasaustausch beteiligt. Die Pneumozyten Typ-II sind kubische Zellen und machen etwa 10% der Alveolenoberfläche aus. Die Hauptaufgabe besteht in der Produktion von Surfactant sowie dem Ionen- und Wassertransport (alveoläre Clearance). Nach einer Lungenschädigung, dienen die Pneumozyten Typ-II als Progenitorzellen

für die Pneumozyten Typ-I [26]. Surfactant besteht aus Phospholipiden und Proteinen und kleidet die Oberfläche der Alveolen aus. Dadurch wird die alveoläre Oberflächenspannung reduziert, was ein Kollabieren der Alveolen (Atelektasen) verhindert [27].

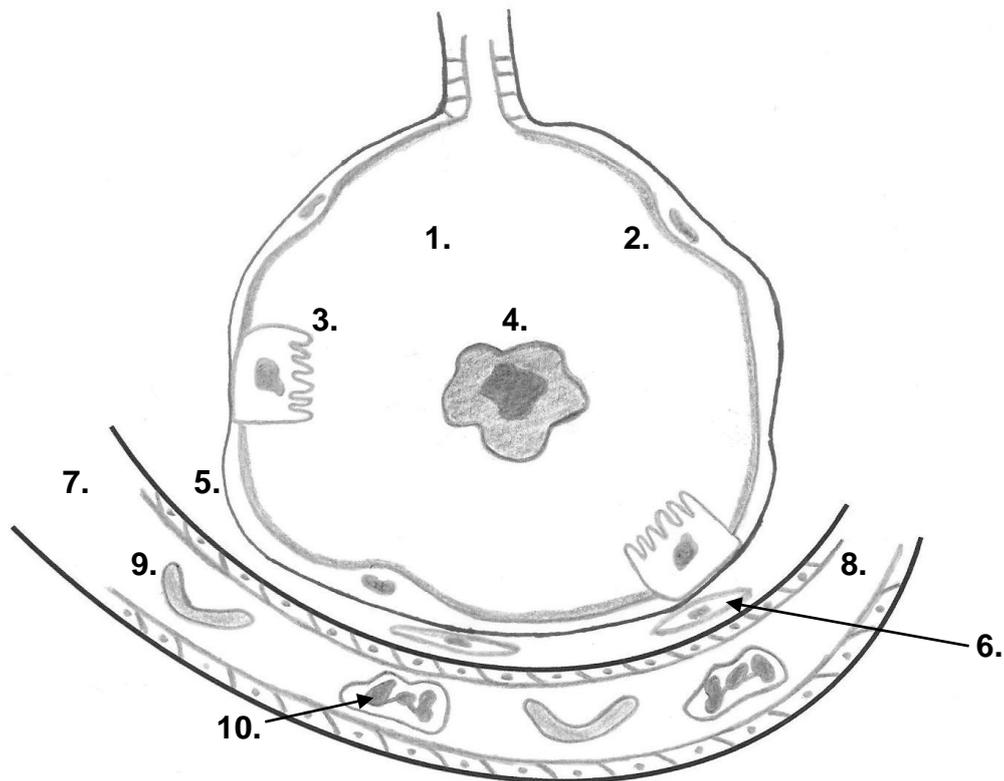


Abbildung 1.1: Darstellung einer Alveole: 1. Alveolarraum; 2. Pneumozyt Typ I mit Surfactant-Schicht; 3. Pneumozyt Typ II; 4. Alveolarmakrophage; 5. Interstitium; 6. Fibroblast; 7. Kapillare; 8. Endothel; 9. Erythrozyt; 10. Neutrophiler Granulozyt

1.1.5 Pathophysiologie

Das ARDS wird histopathologisch in drei Phasen eingeteilt. Die akute bzw. exsudative Phase, die proliferative Phase und die fibrotische Phase. Je nach Verlauf des ARDS können diese Phasen fließend ineinander übergehen. Die exsudative und proliferative Phase können aber auch überlappend ablaufen [28-30].

Durch eine diffuse Schädigung der alveolären Epithelschicht und der vaskulären Endothelschicht kommt es in der akuten exsudativen Phase zu einer Schädigung der Pneumozyten Typ I und der Zell-Zell-Verbindungen. Die Folge ist eine Erhöhung der Permeabilität (sog. Capillary leak) und dadurch bedingt, kommt es zur Ausbildung eines proteinreichen Ödems in Interstitium und Alveolarraum und damit zu einer Zunahme der alveolokapillären Membrandicke. Im Alveolarraum kommt es zusätzlich zu einer Ansammlung von Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten [28, 29, 31]. Über die geschädigte alveoläre Epithelschicht bildet sich eine hyaline Membran aus [28, 29].

Nach etwa einer Woche geht die exsudative Phase fließend in die proliferative Phase über [28, 29]. Diese Phase ist gekennzeichnet durch die Proliferation der Pneumozyten Typ-II, Myofibroblasten und Makrophagen [28, 32]. Die Proliferation der Myofibroblasten findet im Interstitium sowie in der Alveolarwand statt und es kommt zur Einwanderung der Myofibroblasten in den Alveolarraum. Zusätzlich kommt es auch zu Kollagenablagerungen in den Alveolen [29]. Die Proliferation der Pneumozyten Typ-II ist in mehrfacher Hinsicht für den ARDS-Verlauf wichtig. Zum einen dienen die Typ-II-Pneumozyten als Progenitorzellen für die Typ-I-Zellen. Somit wird ein Wiederaufbau der alveolären Epithelschicht gewährleistet [29, 31]. Zum anderen sind die Pneumozyten Typ-II für die Surfactant-Produktion und für die alveoläre Clearance zuständig [26, 31]. Der Surfactant verhindert, durch die Reduzierung der alveolären Oberflächenspannung, die Atelektasenbildung. Das vorhandene Lungenödem wird durch die alveoläre Clearance abtransportiert. Das Ausmaß der Clearance ist abhängig von der Anzahl der Pneumozyten Typ-

II. Eine höhere alveoläre Clearance ist mit einer niedrigeren Mortalität, mit einer kürzeren Dauer der mechanischen Ventilation und mit einem besseren Outcome assoziiert [33, 34].

Bei wiederholten diffusen Schädigungen oder bei frustranen Reparaturversuchen der Epithelschicht, kann die proliferative Phase nach ungefähr drei Wochen in die fibrotische Phase übergehen [28, 29]. Diese Phase ist durch die irreversible Fibrosierung der Lungenstruktur und durch den Umbau des pulmonalen Gefäßbettes gekennzeichnet. Der Innendurchmesser der pulmonalen Arterien wird durch die Proliferation der Intima vermindert, was eine pulmonale Hypertension zur Folge hat. Zusätzlich ist eine vermehrte Dilatation der pulmonalen Kapillaren zu erkennen. All diese Umbauprozesse führen zu einer Abnahme der Compliance, Erhöhung der Totraumventilation und Beeinträchtigung des Gasaustausches mit der Entstehung einer Hypoxämie [31, 35, 36].

1.1.6 Therapie

Eine spezifische Therapie des ARDS gibt es zurzeit noch nicht, wobei verschiedene Studien zeigen konnten, dass eine lungenprotektive Beatmung die Mortalität von ARDS signifikant senken kann [37-39]. Auch die Langzeitüberlebensrate kann durch die lungenprotektive Beatmung verbessert werden [40]. Die lungenprotektive Beatmung beinhaltet die mechanische Ventilation mit einem niedrigen Tidalvolumen (6 ml/ kg Körpergewicht (KG)), einem eingestellten PEEP und die Druck-limitierte Ventilation mit einem niedrigen End-Inspiratorischen Plateau Druck (<30 cmH₂O) [37-39, 41]. Bereits Ashbaugh et al. beschrieb den hohen Nutzen der PEEP-Beatmung im Rahmen der Hypoxämie- und Atelektasen-Behandlung [2]. Bei schweren Verläufen mit einer anhaltenden Hypoxämie kann die Extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) als Lungenersatzverfahren durchgeführt werden. Die frühe Verabreichung des Muskelrelaxanz Cisatracurium für 48 Stunden, scheint ebenfalls die Mortalität senken zu können [42]

Ein weiterer wichtiger Therapieansatz besteht darin, die jeweilige ARDS-Ursache zu behandeln und unterstützende Maßnahmen durchzuführen [43]. Die Durchführung der Bauchlage, als unterstützende Maßnahme, reduziert ebenfalls die Mortalität [44, 45]. Ein restriktives Flüssigkeitsmanagement trägt zur Verbesserung der Lungenfunktion bei und verkürzt die Dauer der invasiven Beatmungsnotwendigkeit [43, 46]. Andere Studien zeigten, dass z.B. die Surfactant-Therapie [47], die Stickstoffmonoxid-Inhalation [48] und die Verabreichung von Glukokortikoiden [49, 50] keinen positiven Effekt im ARDS-Verlauf erzielten.

1.2 Lipopolysaccharid und ARDS

Die Begriffe Endotoxin und Lipopolysaccharid (LPS) werden häufig synonym verwendet. Wobei das Endotoxin ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien ist und erstmals 1892 von Pfeiffer R. beschrieben wurde [51] und der Begriff LPS ein chemisch gereinigtes Endotoxin beschreibt [52, 53]. Das LPS-Molekül setzt sich chemisch aus einem Polysaccharid- und einem Lipid-Anteil zusammen, welche durch einen inneren und äußeren Kern verbunden sind [52, 53]. Der Lipid A-Anteil verankert das LPS-Molekül in der äußeren Zellwand-Membran und ist kovalent an das Polysaccharid gebunden. Der Polysaccharid-Anteil besteht aus aneinander gereihten Zuckermolekülen. Die Anzahl der Zuckermoleküle variiert je nach Bakterienart [52]. Der innere Kernbereich und das Lipid A sind für die toxischen Effekte des LPS-Moleküls verantwortlich [53].

Studien zeigen, dass eine inhalative Applikation von LPS ein ARDS induzieren und ARDS-krankheitstypische Merkmale ausbilden kann [53-55]. Unter anderem kommt es bei jungen gesunden Studienteilnehmern zu einer Einwanderung Neutrophiler Granulozyten in die Lunge und zu einer Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen [54]. Auch an Mausmodellen wird gezeigt, dass eine LPS-Inhalation zu einer Einwanderung Neutrophiler Granulozyten in die Lunge führt [55].

Wird das LPS inhalativ verabreicht, bindet das LPS im Alveolarraum mit Hilfe des LPS-Binding-Protein (LBP) an den Cluster of Differentiation (CD) 14-Rezeptor der Alveolarmakrophagen [56]. Der CD14-Rezeptor ist ein Glycosylphosphatidyl-Inositol- Oberflächenprotein. Dieses Protein wird von Monozyten, Makrophagen und aktivierten Granulozyten exprimiert [57, 58]. Der Dreier-Komplex (LBP/LPS/CD14) aktiviert zusammen mit dem Toll-Like-Rezeptor-4/MD-2 (TLR-4/MD-2)-Komplex den Transkriptionsfaktor Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B) und löst eine proinflammatorische Signalkaskade aus [56, 59]. Diese Signalkaskade beinhaltet die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Chemokine wie Interleukin-8 (IL-8), Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2), Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1). Auch Adhäsionsmoleküle wie Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und E-Selektin werden vermehrt exprimiert [54, 60-62]. Während Alveolarmakrophagen überwiegend TNF- α und IL-1 ausschütten, werden MCP-1 und IL-8 v.a. von Pneumozyten Typ-II gebildet und freigesetzt. Die Sekretion von TNF- α , IL-1, MCP-1 und IL-8 steigt nach der LPS-Applikation bis auf das 4-6fache [62, 63]. Die im Alveolarraum, ausgeschütteten Zytokine und Chemokine werden mittels Transzytose von der abluminalen Seite auf die luminalen Seite des Endotheliums der Kapillaren transportiert und werden von den Endothelzellen, den neutrophilen Granulozyten präsentiert. Der genaue Ablauf der Transzytose und der Chemokin-Zytokin-Präsentation ist noch nicht vollständig geklärt. Man nimmt an, dass Glycosaminoglycane (GAGs) und Duffy Antigen/ Receptor for Chemokines (DARC) beteiligt sind [64]. Es wird vermutet, dass der DARC, der von kapillären Endothelzellen und Pneumozyten Typ-I exprimiert wird, am Chemokin-Transport durch das Endothel beteiligt ist [65, 66]. Die GAGs, welche u.a. auf der Zelloberfläche der vaskulären Endothelzellen und der Leukozyten lokalisiert sind, sind für die Chemokin-Bindung und -Präsentation verantwortlich [67]. Die Chemokin-Präsentation bewirkt eine Aktivierung Neutrophiler Granulozyten und es kommt zum vermehrten Granulozyten-Einstrom (Migration) in die Lunge [53, 55, 68].

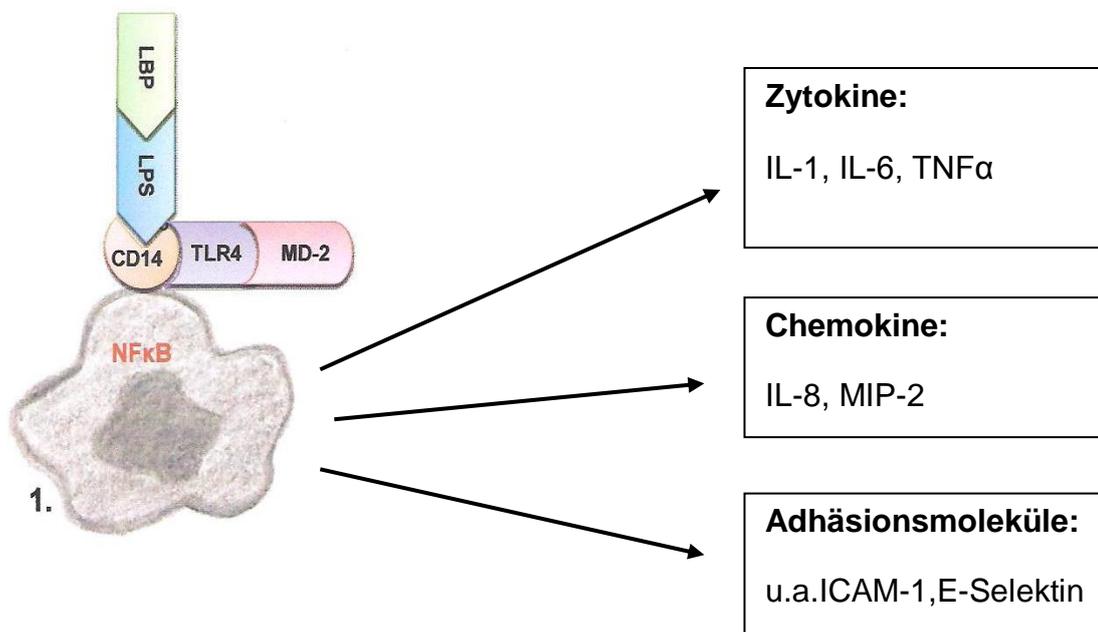


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der LPS-induzierten Inflammation: 1. Alveolarmakrophage. Der LBP/LPS/CD-14-Komplex aktiviert zusammen mit dem TLR-4/MD-2-Komplex die NF-κB-Signalkaskade. Es werden u.a. proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle ausgeschüttet. LPS (Lipopolysaccharid); LBP (LPS-binding Protein); CD14 (Cluster of Differentiation 14); TLR4/MD-2 (Toll-Like-Receptor-4); IL-1 (Interleukin-1); IL-6 (Interleukin-6); TNF-α (Tumornekrosefaktor-α); IL-8 (Interleukin-8); MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2); ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)

1.3 Neutrophile Granulozyten und deren Migration in die Lunge

Neutrophile Granulozyten, auch polymorphonucleare Leukozyten (PMN) genannt, reifen im Knochenmark. Es werden täglich 10^{11} PMNs in die Blutbahn freigesetzt. PMNs machen einen Anteil von 50-60% der Leukozyten aus. Sie haben eine durchschnittliche Lebenszeit von 6,5 Stunden und werden hauptsächlich von Milz und Leber abgebaut. Die PMNs sind Teil des angeborenen Immunsystems und haben die Aufgabe Pathogene zu erkennen und zu zerstören [69-71]. Mäuse haben einen Anteil Neutrophiler Leukozyten von 75-90% [72].

PMNs werden im Rahmen einer Immunantwort, durch Chemokine und Zytokine frühzeitig aktiviert und sind daraufhin in der Lage, an den Entzündungsort zu migrieren. Beim ARDS migrieren die aktivierten PMNs aus der Blutstrombahn durch das Endothel und Epithel in das Lungeninterstitium und in den Alveolarraum. Die PMNs, welche einen durchschnittlichen Durchmesser von 6 bis 10 μm haben, müssen bei der Migration ihre Form ändern, damit sie durch die durchschnittlichen 5,5 μm großen Lungenkapillarzellen hindurch passen [73-75].

Bei der Migration werden folgende Phasen unterschieden: Adhäsion, intravaskuläres crawling und die parazelluläre oder transzelluläre Migration. Die Adhäsion wiederum wird in rolling, Aktivierung und Arrest eingeteilt. In allen Phasen der Migration sind zahlreiche Liganden und Adhäsionsmoleküle beteiligt, welche das Migrieren der PMNs möglich machen [74, 76, 77].

Die Aktivierung der PMNs erfolgt durch die ausgeschütteten Chemokine und Zytokine (siehe Abschnitt 1.2) und bewirkt eine Veränderung des Zytoskelett der PMNs. Dies hat zur Folge, dass die Fähigkeit der Verformbarkeit abnimmt und die PMNs in den Lungenkapillaren und postkapillaren Venolen verstärkt akkumulieren. Die Akkumulation wird durch Integrine und L-Selektin vermittelt [78-80]. Im Folgenden werden die PMNs an die kapillaren Endothelzellen gebunden (sog. capture) und damit wird das rolling der PMNs (entlang rollen auf den Endothelzellen) ermöglicht. Das Capture der PMNs wird durch die Bindung von Selektine an den P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL-1) begünstigt. Das rolling wird durch L-, E- und P-Selektine und den PSGL-1 vermittelt. Das P-Selektin, E-Selektin und das PSGL-1 werden von den entzündlichen Endothelzellen exprimiert. Zusätzlich wird das P-Selektin von den Thrombozyten und das PSGL-1 von Leukozyten exprimiert [76, 77]. Anschließend werden die gebundenen PMNs durch Chemokine aktiviert und arretieren an der Oberfläche der Endothelzellen. Diese sog. Arrest-Phase wird durch Integrine und Adhäsionsmoleküle vermittelt. Die Integrine sind transmembrane Glykoproteine und setzen sich aus einer α - (CD11a,b,c oder d) und einer β -Kette (CD18) zusammen. In der Arrest-Phase nimmt das β_2 -Integrin

eine entscheidende Rolle ein. Das β_2 -Integrin, welches sich aus der α -Kette CD11a und der β -Kette CD18 zusammensetzt (CD11a/CD18), bindet u.a. an das ICAM-1 und an das Vascular-Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). Das ICAM-1 ist physiologisch v. a. auf der Oberfläche der Pneumozyten Typ-I, nahe der Zell-Zell-Verbindungen den Tight junctions, lokalisiert. Auch auf den Oberflächen der kapillaren Endothelzellen, der Pneumozyten Typ-II und den bronchialen Epithelzellen wird das ICAM-1 in geringer Konzentration exprimiert [81-83]. Die Expression des ICAM-1 wird durch die inflammatorische Stimulation von IFN- γ , TNF- α und IL-1 erhöht [82, 83]. Im Anschluss an die Arrest-Phase wird die Adhäsion der PMNs an den Endothelzellen durch intrazelluläre Signalwege verstärkt und es folgt das intravaskuläre crawling (kriechen der PMNs) [76, 77]. Beim intravaskulären crawling, binden die Leukozyten-Ausläufer in den Zell-Zell-Zwischenräumen an die Endothelzellen und an die Zell-Zell-Verbindungen. Diese Bindung wird durch das ICAM-1 und das Makrophagen-Antigen-1 (MAC-1 oder CD11b/CD18) vermittelt und es folgt ein intrazellulärer Calcium-Anstieg und die Aktivierung der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38-MAPK). Die Calcium-Erhöhung und die aktivierte p38-MAPK haben zur Folge, dass die Myosin-Leicht-Ketten-Kinase (Myosin-light-chain-Kinase) aktiviert wird und somit der Zell-Zell-Kontakt zwischen den Endothelzellen vergrößert und geöffnet wird [76, 77]. Die parazelluläre Migration wird hauptsächlich durch das Vaskulär-Endotheliale Cadherin (VE-Cadherin) und das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-; PECAM-1) ermöglicht. Das junctionale Adhäsions-Molekül-A (Junctional Adhesion Molecule-A; JAM-A), das Endothelzellen-selektive-Adhäsionsmolekül (ESAM), das ICAM-2 und der CD99 sind ebenfalls an der parazellulären Migration beteiligt [76, 77].

Bei der transzellulären Migration, welche in Abschnitten mit sehr schmalen Epithelzellen stattfindet, bilden ICAM-1-enthaltende Caveolae (Einbuchtungen der Plasmamembran) einen intrazellulären Kanal (sog. vesiko-vakuoläre Organellen; VVO). Durch diesen VVO-Kanal können die PMNs transzellulär

migrieren [77, 84]. In der folgenden Abbildung sind die Phasen der Migration dargestellt.

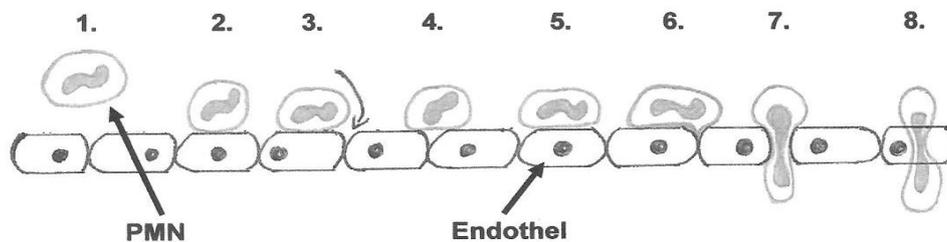


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der PMN-Migration. 1. Aktivierung der PMNs durch ausgeschüttete Zytokine und Chemokine, 2. Capture (die PMNs binden an die Endothelzellen), 3. Rolling, 4. Arrest, 5. Adhäsion, 6. intravaskuläres Crawling, 7. Parazelluläre Migration, 8. Transzelluläre Migration. Modifiziert nach [77].

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und Respiratory Burst

Die proinflammatorischen Zytokine (TNF- α , IL-1), LPS und auch die Granulozyten-Ansammlung in der Lunge führen zur Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [26, 60]. Auch die Bindung der PMNs an ICAM-1 auf aktivierten Endothelzellen führt zur Bildung von ROS [85]. Diese entstehen in den Mitochondrien der aktivierten Alveolarmakrophagen, pulmonalen Endothel- und Epithelzellen und PMNs [26, 60, 86]. Die Freisetzung von ROS aus aktivierten PMNs bezeichnet man als Respiratory Burst. Durch die Interaktion zwischen einem Liganden und einem, auf dem PMN befindlichen, transmembranen Rezeptor, kommt es zu einer Veränderung des Membranpotentials, welches infolge die Produktion von ROS einleitet [78, 86, 87]. Die Liganden-Rezeptor-Interaktion bewirkt auch einen intrazellulären Calciumanstieg [88, 89], welcher für die Degranulation erforderlich ist [90]. Es kommt zur Degranulation von spezifischer und azurophiler Granula, welche unterschiedliche Enzyme enthalten und welche die pathogenen Erreger zerstören [78, 90]. Die Zerstörung findet mittels Phagozytose statt, indem die freiwerdende spezifische und azurophile Granula mit der Plasmamembran sog.

Phagolysosomen bilden, in denen die Phagozytose der pathogenen Erreger stattfindet [78]. Findet die Phagozytose extrazellulär statt, gelangen ROS und die Granulaenzyme folglich auch in den extrazellulären Raum und bewirken in dem Bereich Gewebs- und Zellschäden [71, 78] ROS sind an der Lipid-, Protein- und DNA-Oxidation beteiligt und führen somit zu Zellschäden. Dies hat u.a. eine erhöhte Permeabilität des Endothels, mit der Ausbildung eines Lungenödems, zur Folge [26, 91]. ROS führt auch zu einer Veränderung des Zytoskelett der Endothelzellen, was ebenfalls den Durchtritt der PMNs erleichtert.[85]

1.5 Zytokine

Zytokine sind Akute Phase-Proteine und werden innerhalb der ersten Stunden nach einem inflammatorischen Stimulus, z.B. nach einer Infektion oder nach einer Gewebsschädigung produziert und sezerniert. Sie spielen in der Immunantwort eine entscheidende Rolle. Zu den wichtigsten Zytokinen gehören das Interleukin-1, der Tumornekrosefaktor- α und das Interleukin-6.

1.5.1 Interleukin-1

Interleukin-1 (IL-1) ist ein Polypeptid und gehört zur Gruppe der Zytokine. Es wird innerhalb der ersten Stunden nach einer Infektion oder nach einer Gewebsschädigung freigesetzt. Hauptsächlich wird IL-1 von Makrophagen gebildet. Aber auch Epithelzellen, B- und T-Lymphozyten, Natürliche Killer-Zellen, Astrozyten, Keratinozyten, Gefäßendothelzellen und glatte Muskelzellen bilden IL-1 und setzen es frei [92]. Eine IL-1-Erhöhung findet man nicht nur im Rahmen von verschiedenen Erkrankungen und Infektionen, sondern auch in einem physiologisch gesunden Zustand, wie z. B. während der Ovulation, nach anstrengenden Sporttätigkeiten und nach einer UV-Licht-Exposition [92, 93]. IL-1 übernimmt eine wichtige Rolle in der Einleitung der Immunantwort, in dem es viele systemische Veränderungen induziert [92]. Im zentralen Nervensystem

(ZNS) wirkt es u.a. auf das hypothalamische Thermoregulationszentrum und ist somit an der Fieberentstehung beteiligt. Aus diesem Grund wurde das IL-1 in den 1940-iger Jahren auch endogenes Pyrogen genannt [93]. Weitere zentralnervöse Veränderungen sind Müdigkeit, Appetitverlust und eine Steigerung der Neuropeptid-Freisetzung (Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und Somatostatin). Metabolische Veränderungen machen sich in der herabgesetzten Albuminsynthese und in der Hemmung des Cytochrom P-450-Metabolismus in der Leber bemerkbar. Zusätzlich wird noch der Insulinhaushalt beeinflusst. Eine Laktatazidose wird ebenfalls begünstigt. Durch die IL-1-Wirkung, wird auch die Synthese von Prostaglandin₂ (PGI₂) , Prostaglandin E₂ (PGE₂) und dem Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) in den vaskulären Endothelzellen und den glatten Muskelzellen gesteigert. Diese sind stark wirkende Vasodilatoren und bewirken eine rasch einsetzende Hypotonie [92]. Des Weiteren induziert IL-1 die Synthese von IL-2, Interferonen, IL-3 und IL-6. IL-1 steigert auch die Proliferation von B- und T-Lymphozyten und wirkt chemotaktisch auf Diese [92-94].

IL-1 wirkt mit anderen Zytokinen, v.a. mit dem Tumornekrosefaktor- α , synergistisch. D.h. die Effekte bei einer gemeinsamen Wirkung sind ausgeprägter, als bei einer alleinigen Wirkung [92, 95].

1.5.2 Tumornekrosefaktor- α

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein Peptidhormon und ist ebenfalls ein Zytokin [96]. TNF- α nimmt eine wichtige Rolle in der Infektionsantwort ein und wird v.a. von Makrophagen und Phagozyten produziert und ausgeschüttet [97, 98]. Es ist beteiligt an der Regulation der Expression der akute Phase-Proteine in der Leber [99].

Rezeptoren mit einer hohen Bindungsaffinität für TNF- α , befinden sich hauptsächlich in der Leber, Lunge, Niere, Haut und im Gastrointestinal-Trakt. [100] Eine erhöhte TNF- α -Ausschüttung bewirkt u.a. eine pulmonale

Schädigung und intravasal begünstigt es die Entstehung einer nekrotischen Thrombose durch eine erhöhte Koagulation. Zusätzlich kommt es zu einer Laktatausschüttung aus den Muskeln mit einer folgenden Laktatazidose. TNF- α hat auch Einfluss auf den Blutzuckerhaushalt. Es kommt zu einem biphasischen Verlauf mit einer Initial zuerst auftretenden Hyperglykämie aufgrund der erhöhten Glukagonfreisetzung, gefolgt von einer schweren Hypoglykämie aufgrund der Leberschädigung [95-98].

TNF- α hat zum Teil eine überschneidende Wirkung mit IL-1 und ist z.B. ebenfalls an der Entstehung von Fieber beteiligt und stimuliert die Produktion des Vasodilatators PGE₂ mit einer ausgeprägten Hypotonie und einem Schockzustand als Folge [98, 101, 102]. Es verstärkt auch die phagozytische Aktivität der neutrophilen Leukozyten[99].

Zusätzlich induziert TNF- α die IL-1-Freisetzung in den Endothelzellen und Makrophagen[98].

Als Synonym für TNF- α wird auch der Begriff Cachectin verwendet, da es in der Entstehung des Kachexiesyndroms eine zentrale Rolle spielt. Ein chronisch erhöhter TNF- α -Spiegel bewirkt eine Syntheseerhöhung der anabolischen Enzyme [98, 103].

1.5.3 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Polypeptid und gehört zu der Gruppe der Zytokine [104]. Es wird, neben IL-1 und TNF- α , auch in der frühen Phase der Inflammation gebildet und ausgeschüttet. Das IL-6 wird nicht nur von T- und B-Lymphozyten produziert, sondern u.a. auch von Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und von verschiedenen Tumorzellen [104].

Als Synonym für IL-6, wird auch der Begriff B-Zell-stimulierender-Faktor-2 (BSF-2) verwendet [105-108]. An B-Lymphozyten induziert IL-6 die letzte Stufe der Differenzierung in Antikörper-produzierende Zellen [104, 107, 109, 110]. Neben der Beteiligung an der B-Zell-Differenzierung, besitzt das IL-6 noch

weitere Wirkungen und Funktionen. In der Leber induziert IL-6 die Synthese der Akute-Phase-Proteine (v.a. das C-reaktive-Protein (CRP), das Serum Amyloid A, das Haptoglobin und das Fibrinogen) [111, 112]. In Anwesenheit von IL-2, induziert IL-6 die Proliferation und Differenzierung von zytotoxischen T-Lymphozyten [104, 113, 114]. Darüber hinaus induziert IL-6 die Expression des IL-2-Rezeptors auf den T-Lymphozyten [115] sowie die Produktion von IL-2 durch T-Lymphozyten [116].

1.6 Chemokine

Chemokine sind kleine Proteinmoleküle (8-14 kDa), welche über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, auf eine Vielzahl an Zellen wirken. Sie induzieren die Chemotaxis v.a. der neutrophilen Granulozyten (PMNs) und der Lymphozyten. Die Chemokine werden, abhängig von der Anordnung des N-terminalen Cysteinrestes, in 4 Gruppen eingeteilt: CXC, CC, XC und CX₃C [117, 118].

1.6.1 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8, CXCL 8) gehört zu der Gruppe der Chemokine und vermittelt seine Wirkung im humanen Organismus über den CXC Rezeptor 1 (CXCR1) und den CXC Rezeptor 2 (CXCR2) [117]. Das IL-8, auch Neutrophil-Activating Protein-1 (NAP-1) genannt, hat eine starke chemotaktische Wirkung auf PMNs [118, 119]. Es wird von humanen Alveolarmakrophagen und von pulmonalen Epithelzellen produziert. Viele weitere Zellen, wie mononukleäre Phagozyten, Endothelzellen, Keratinozyten, Hepatozyten und Fibroblasten produzieren ebenfalls IL-8. Die Synthese wird durch die Zytokine IL-1 und TNF- α , sowie durch LPS und Viren induziert [118, 120-122].

Das IL-8 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und im Outcome des ARDS [123]. Es konnte gezeigt werden, dass bei ARDS-Patienten erhöhte IL-8-Konzentrationen in der Bronchoalveolaren Lavage (BAL) vorliegen und dass eine erhöhte IL-8-Konzentration mit einem erhöhten PMN-Einstrom in den

Alveolarraum einhergeht. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte IL-8-Konzentration mit einer höheren Mortalitätsrate verbunden ist [124].

Neben der starken chemotaktischen Wirkung auf die Neutrophilen Granulozyten, erhöht IL-8 auch die vaskuläre und endotheliale Permeabilität [125, 126]. Ebenfalls hat es eine Wirkung auf die Adhäsion der Neutrophilen Granulozyten. Durch Expression eines CD11/CD18-Komplexes auf deren Zelloberfläche, wird die Adhäsion am Gefäßendothel begünstigt [122, 127, 128]. Zusätzlich trägt es zur Formänderung Neutrophiler Granulozyten, zur Degranulation und zum Respiratory burst bei [122, 129].

Es gibt bei Mäusen bzw. Nagetieren kein Chemokin, welches dem IL-8 strukturell ähnlich ist. Die Chemokine CXCL1 (Keratinocyte-derived Chemokine, KC) und CXCL2/3 (Macrophage Inflammatory Protein 2, MIP-2) sind die funktionellen Äquivalente zum IL-8 [130, 131]. Beide Chemokine wirken über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR2 [131].

1.6.2 Stromal cell-Derived Factor-1/ CXCL12 und seine Rezeptoren

Der Stromal cell-Derived Factor-1 (SDF-1) ist ein wichtiges Chemokin aus der CXC-Gruppe und sein systematischer Name ist CXCL12. SDF-1 vermittelt seine Effekte durch die Bindung und Aktivierung seiner G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXC Rezeptor 4 (CXCR4) und CXC Rezeptor 7 (CXCR7) [117, 132, 133].

SDF-1 wird von verschiedenen Organen produziert und freigesetzt. U.a. wird das Chemokin von der Lunge, der Leber, dem Gehirn, dem Herz und dem Knochenmark exprimiert. SDF-1 nimmt ebenfalls eine wichtige Rolle in der fetalen pulmonalen Entwicklung ein [134]. Auch bei Organschäden, wie z.B. Herzinfarkt, Leberschäden oder Chemotherapie-assoziierte Organschäden, wird SDF-1 freigesetzt [133]. Eine erhöhte Freisetzung ist auch bei ALI zu verzeichnen [135].

Der CXCR4 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor und wird auf verschiedenen Zelloberflächen exprimiert, u.a. auf Lymphozyten, hämatopoetischen Stammzellen, Endothel- und Epithelzellen und Tumorzellen. Die Bindung mit SDF-1 (SDF-1/CXCR4) setzt nachfolgend eine Reihe an intrazellulären Signalkaskaden in Gang [133].

Die SDF-1/CXCR4 - Bindung hat einen intrazellulären Calciumanstieg zur Folge und ist an vielen weiteren physiologischen Prozessen beteiligt. Es reguliert u.a. die B-Zell-Lymphopoese, die Myelopoese, die Prä-B-Zell-Proliferation und die Mobilisation, Retention und Homing der hämatopoetischen Stammzellen. SDF-1/CXCR4 nimmt auch eine wichtige Rolle in der Differenzierung, Proliferation und Migration der Leukozyten ein [133, 136-139]. Während einer Entzündung, ist SDF-1/CXCR4 an der schnellen Freisetzung Neutrophiler Leukozyten aus dem Knochenmark involviert [139].

Ebenfalls ist SDF-1/CXCR4 an der kardialen und neuronalen Entwicklung und an der Organvaskularisation in der Embryogenese beteiligt [132, 136, 140]. Aufgrund der CXCR4 - Expression auf Tumorzellen, spielt die SDF-1/CXCR4 - Bindung auch bei der Tumorentstehung, der Angiogenese und der Metastasierung eine wichtige Rolle [133]. Der CXCR4 nimmt auch eine zentrale Rolle bei der Infizierung mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HI-Virus) ein. Der HI-Virus dringt über den CXCR4 in die CD4-Lymphozyten ein [140].

SDF-1 kann auch noch mit einem zweiten Rezeptor eine Bindung eingehen. Mit dem Rezeptor CXCR7. CXCR7 ist ebenfalls ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor und wird von verschiedenen Tumorzellen, aktivierten Endothelzellen und fetale Leberzellen exprimiert [132]. T- und B- Lymphozyten und Natürliche Killer-Zellen exprimieren ebenfalls CXCR7 [141]. Aber im Gegensatz zum CXCR4, fehlt beim CXCR7 die Aktivierung der klassischen Signalübertragung. Levoye et al. zeigen, dass CXCR7 nicht die G_{α_i} -Protein-abhängige Signalübertragung triggert. CXCR7 interagiert mit G_{α_i} -Proteinen und macht eine SDF-1-vermittelte Konformitätsänderung durch [142]. CXCR7 kann auch als Co-Rezeptor für den CXCR4 fungieren bzw. können CXCR4 und CXCR7 ein

Heterodimer bilden und somit die SDF-1-induzierte Signalübertragung verbessern [141, 142].

CXCR7 ist am Zellüberleben und an der Zelladhäsion beteiligt [132]. Sierro et al. zeigen am Mausmodell, dass CXCR7 auch eine wichtige Rolle in der Endothelialbiologie und in der Herzklappenentwicklung spielt [141]. Ebenfalls fördert CXCR7 auch die Tumorbildung und die Metastasierung [132, 143, 144].

Eine erhöhte CXCR7-Expression ist auch im hypoxischen Lungengewebe zu verzeichnen, z.B. im Rahmen einer hypoxisch-induzierten pulmonalen Hypertension [145-147]. Auch kann die CXCR7-Aktivierung wichtig für die Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark und in lymphatischen Organen sein [148].

1.7 Adenosin in der akuten pulmonalen Inflammation

Das Nukleosid Adenosin setzt sich zusammen aus der Purinbase Adenin und dem Zuckermolekül Ribose. Adenosin ist im Körper an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert und stellt somit ein wichtiges Molekül dar. Es ist Bestandteil in den Adeninnukleotiden Adenosintriphosphat (ATP) und im Adenosindiphosphat (ADP). ATP und ADP dienen als Energielieferanten für alle Zellen und deren Prozesse. Ebenfalls ist Adenosin Bestandteil im zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP), welches bei der intrazellulären Signalkaskade eine wichtige Rolle spielt. Die Purinbase Adenin ist eine von vier Basen, welche in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und in der Ribonukleinsäure (RNA) vorkommt [149, 150]. Das Adenosin befindet sich intrazellulär und wird durch den Abbau von Adeninnukleotiden gebildet. Unter physiologischen Bedingungen, beträgt die intrazelluläre Adenosinkonzentration $<1\mu\text{mol/Liter}$ [151, 152]. Die intrazelluläre Produktion von Adenosin ist v.a. bei einer Hypoxie, Ischämie, Trauma und entzündlichen Prozessen erhöht [151, 153]. Martin et al. zeigen, dass die Plasma-Adenosinkonzentration im septischen Schock deutlich ansteigen ($8,4 \pm 3,5\mu\text{mol/Liter}$) [152].

Das intrazellulär gebildete Adenosin gelangt, mit Hilfe von speziellen Zelltransportern, in den extrazellulären Raum (EZR) [151, 153]. Bei Zellwandschädigungen, im Rahmen von Hypoxie, Ischämie oder entzündlichen Prozessen, kommt es zu einem direkten ATP-Ausstrom von intra- nach extrazellulär und zu einem massiven extrazellulären ATP-Anstieg [151]. Im EZR wird das ATP mittels zwei Enzymreaktionen zu Adenosin abgebaut. Im ersten Schritt wird ATP mittels der ATP-Diphosphohydrolase (CD39) zu AMP abgebaut. Im zweiten Schritt wird das AMP mittels ecto-5'-Nukleotidase (CD73) zu Adenosin hydrolysiert [151, 153, 154]. Es zeigen sich erhöhte Transkriptmengen von CD39 und CD73 beim LPS-induzierten ALI [155]. Reutershan et al. konnten zeigen, dass es bei CD39- und CD73-gendefizienten Mäusen zu einer erhöhten PMN-Ansammlung im Interstitium und im intraalveolären Raum kommt [155]. Adenosin ist involviert, die Einwanderung der PMNs in die Lunge abzuschwächen, die Zytokinfreisetzung zu reduzieren und die pulmonale Inflammation und das Lungenödem abzuschwächen [155-157]. Adenosin spielt ebenfalls bei entzündlichen Atemwegserkrankungen, z.B. bei Asthma und bei chronischer obstruktiver Lungenerkrankung (chronische obstruktive pulmonal disease, COPD) eine wichtige Rolle [158].

Im EZR kann Adenosin über Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren seine Wirkung vermitteln. Es gibt vier Adenosinrezeptoren: A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃. Diese werden von Leukozyten, Endothel- und Epithelzellen exprimiert [153, 159, 160]. Adenosin-abhängige Wirkungen können sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte auslösen [153, 160]. Linden et al. fasst die Adenosinwirkung in folgende vier Gruppen zusammen [153].

1. Adenosin erhöht bzw. verbessert das Verhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffnachfrage
2. Adenosin fördert die ischämische Präkonditionierung
3. Adenosin stimuliert die Angiogenese und
4. Adenosin ist auch an anti-inflammatorischen Effekten beteiligt

Tabelle 1.2 fasst die wichtigsten physiologischen Funktionen, welche durch die Aktivierung der Adenosinrezeptoren getriggert werden, zusammen.

Tabelle 1.2: Physiologische Funktionen der Adenosinrezeptoren;

↓=Inhibition/Verminderung; ↑=Erhöhung. Modifiziert nach [151, 160].

Rezeptor	Funktion
A₁	Bradykardie, Lipolyse ↓, Glomeruläre Filtration ↓, ischämische Präkonditionierung, Antinozizeption
A_{2A}	↓ der Plättchenaggregation und PMN, Vasodilatation, Schutz vor ischämischen Schäden
A_{2B}	Relaxation von glatten vaskulären und intestinalen Muskelzellen führt zur Vasodilatation, ↓ Monozyten- und Makrophagenfunktion, Stimulation der Mediatorfreisetzung durch Mastzellen
A₃	↑ Mediatorfreisetzung durch Mastzellen (Maus), Präkonditionierung

Nachfolgend wird noch auf den A_{2B}-Adenosinrezeptor (A_{2B}AR) eingegangen, da in der vorliegenden Arbeit, die protektive Wirkung der CXCR4- und die CXCR7-Inhibition in der Abhängigkeit vom A_{2B}AR in der akuten pulmonalen Inflammation, untersucht wird.

Vom A₂-Adenosinrezeptor (AR) gibt es zwei Subtypen, A_{2A} und A_{2B}. Die Unterscheidung, hängt von der Affinität zum Adenosin ab. Der A_{2A}-Adenosinrezeptor (A_{2A}AR) hat eine hohe Affinität zu Adenosin, während der A_{2B}AR eine schwache Affinität zu Adenosin besitzt [161]. Während die Adenosinrezeptoren A₁, A_{2A} und A₃, bereits bei physiologischen Adenosinkonzentrationen aktiviert werden, benötigt die Aktivierung des A_{2B}AR pathophysiologische Bedingungen und eine erhöhte Adenosinkonzentration [162]. Der A_{2B}AR befindet sich auf Fibroblasten, pulmonalen Epithelzellen [154],

vaskulären Endothelzellen, Makrophagen [161] und bronchialen glatten Muskelzellen [163].

Unterschiedliche Studien zeigen, dass die Aktivierung des A_{2B}AR pro- und anti-inflammatorische Effekte auslösen kann.

Zhong et al. zeigen, dass in einer Hypoxie, die Expression des A_{2B}AR gesteigert ist und dass es durch die Aktivierung des Rezeptors zu einer erhöhten Freisetzung von IL-6 und des Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) kommt. Die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine, erfolgt durch glatte Muskelzellen des Bronchialsystems. Ebenfalls wird die Differenzierung der humanen Lungenfibroblasten zu Myofibroblasten induziert [158, 164]. Auch eine erhöhte IL-6-Freisetzung durch Epithelzellen, Astrozyten und Fibroblasten, ist durch die Aktivierung des A_{2B}AR zu erkennen [153]. Ryzhov et al. zeigen, dass die Aktivierung des A_{2B}AR auf humanen Mastzellen, die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-3, IL-4, IL-8 und IL-13 steigert [165]. Auch Feoktistov et al. zeigen in ihrer Studie, dass durch Hypoxie die Expression des A_{2B}AR in humanen vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen des Bronchialsystems gesteigert ist und dass dadurch die Produktion des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) hochreguliert wird und somit der A_{2B}AR eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt [163]. Zusätzlich wird gezeigt, dass der A_{2B}AR auch auf humanen Mastzellen exprimiert wird und dass durch die Bindung mit der Phospholipase C, die IL-8-Freisetzung erhöht ist [166]. Ebenfalls die Studie von Sun et al. zeigt, dass die A_{2B}AR-Antagonisierung den Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine und Chemokine deutlich reduziert [167].

Andere Studien, welche an A_{2B}AR-Knock-out- (K.o.-) Mäusen durchgeführt wurden, zeigen eine anti-inflammatorische Wirkung des A_{2B}AR. Eine pharmakologische A_{2B}AR-Antagonisierung an Wildtyp-Mäusen, mit LPS-induzierter pulmonaler Inflammation, zeigt eine deutliche Verschlechterung der pulmonalen Inflammation und histologische Gewebsschädigungen. Unbehandelte A_{2B}AR-K.o.-Mäuse, mit einer LPS-induzierten pulmonalen Inflammation, zeigten im Vergleich, die gleiche Ausprägung des

Krankheitsbildes. Wobei die Behandlung der Wildtyp-Mäuse mit einem A_{2B}AR-Agonisten, mit einer Abschwächung der pulmonalen Entzündung und des Lungenödems einhergeht [157]. Es wurde auch gezeigt, dass der A_{2B}AR Entzündungsprozesse, wie z.B. die Leukozytenadhäsion im Gefäßsystem, reguliert [161].

Eckle et al. zeigen, dass A_{2B}AR-K.o.-Mäuse, mit einem Ventilator-induziertem Lungenschaden (Ventilator-Induced Lung Injury, VILI), mit einer geringeren Überlebensrate assoziiert sind. Die Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit einem selektiven A_{2B}AR-Antagonisten, zeigt eine Verschlechterung der pulmonalen Entzündung, des Lungenödems und eine Verschlechterung des Gasaustausches. Während die Behandlung mit einem A_{2B}AR-Agonisten die VILI-Symptome abschwächt [168]. Ebenfalls ist die Gefäßpermeabilität bei A_{2B}AR-K.o.-Mäusen erhöht [169].

Weitere Studien zeigen, dass der A_{2B}-Adenosinrezeptor die CXCR4-Expression reguliert. Yang et al. zeigen, dass in A_{2B}AR-K.o.-Mäusen eine höhere Konzentration an TNF- α besteht, welches die CXCR4-Expression hochreguliert und die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen begünstigt [170].

Im Rahmen einer Tumorentstehung bzw. Metastasierung, erhöht eine hohe Adenosinkonzentration, über die Aktivierung der A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren, eine deutliche Erhöhung der CXCR4-Expression auf den Zelloberflächen der Tumorzellen. Daraufhin können die Tumorzellen zum SDF-1 migrieren. Durch die Bindung mit dem SDF-1 kommt es zu einer Steigerung der Tumorzellproliferation [171]. Nach einem ischämischen Myokardinfarkt, ist ebenfalls durch erhöhte Adenosinkonzentrationen, eine gesteigerte CXCR4-Expression zu verzeichnen. Durch die CXCR4-Expression wird die Migration der endothelialen Vorläuferzellen (Endothelial Progenitor Cells, EPC) zum Herzen gesteigert und somit die Revaskularisierung des ischämischen Herzens begünstigt [172].

1.8 CXC Rezeptor 4-Inhibitor, AMD3100

AMD3100, auch Plerixafor genannt, ist ein kleines Molekül, welches zur Bicyklam-Gruppe gehört. Charakteristisch sind acht Stickstoffmoleküle [173]. Es ist ein reversibler Inhibitor und bindet somit reversibel an den CXC Rezeptor 4 [174]. AMD3100 induziert eine schnelle Mobilisierung humaner Vorläuferzellen (Human progenitor cell, HPC) und Neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark ins Blut, mit einem starken Anstieg der Zellzahl [174]. Es findet im Rahmen der Stammzell-Transplantation beim Non-Hodgkin Lymphom und beim Multiplen Myelom [133] sowie in der HI-Virus-Therapie Anwendung [173].

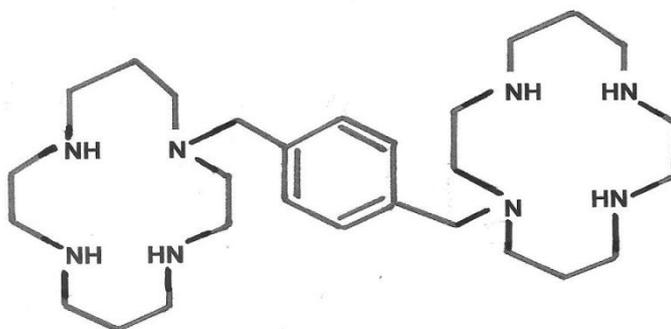


Abbildung 1.4: Chemische Strukturformel von AMD3100. Modifiziert nach [175].

1.9 CXC Rezeptor 7-Inhibitor, CCX771

Das CCX771 ist ein spezifischer Inhibitor des CXC Rezeptor 7 und wird bisher im Rahmen von Forschungsprojekten eingesetzt.

1.10 Fragestellung

Das Krankheitsbild des ARDS stellt auch heutzutage noch hohe Anforderungen an die Intensivmedizin. Aufgrund fehlender Therapieoptionen ist das Syndrom des akuten Lungenversagens weiterhin mit einer hohen Sterblichkeit assoziiert. Aus diesem Grund stellt es eine wesentliche Forschungsaufgabe dar, die zugrundeliegenden Pathomechanismen genauer zu erforschen, um eine Grundlage für die Entwicklung möglicher Therapieoptionen zu schaffen.

Adenosin scheint in der akuten pulmonalen Inflammation eine wichtige Rolle zu spielen, indem es die CXCR4-Expression induziert und dadurch auf die Migration Neutrophiler Granulozyten wirkt. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation eine protektive Wirkung einer CXCR4- und CXCR7-Inhibition in der Abhängigkeit des A_{2B}-Adenosinrezeptors besteht.

- Welche Rolle spielt die CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Abhängigkeit vom A_{2B}-Adenosinrezeptorstatus bei der Migration Neutrophiler Granulozyten *in vivo*?
- Welche Rolle spielt die CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Abhängigkeit vom A_{2B}-Adenosinrezeptorstatus in der Permeabilität der alveolär-kapillären Membranen *in vivo*?
- Welchen Einfluss hat eine CXCR4- und CXCR7-Inhibition auf die LPS-induzierte Sekretion von Zytokinen in Abhängigkeit vom A_{2B}-Rezeptorstatus?

Die Versuche wurden an Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Im Vergleich dazu, wurden alle Versuche auch an A_{2B}AR-Knock-out-Mäusen, welche den A_{2B}-Adenosinrezeptor nicht exprimieren, durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Atemschutzmaske	Aura 1862+	3M, Neuss
Deckgläser	01-2460/1	R. Langenbrinck, Emmendingen
Einbettkassetten Rotilapo	K.113.1	Carl Roth, Karlsruhe
Folie Microseal B MSB	1001	Bio-Rad Laboratories, München
Handschuhe, Peha-soft nitrile	942206	Hartmann, Heidelberg
Kanülen Microlance™ - 24G 1'' 0,55 x 25 mm	304100	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance™ - 27G 3/4'' 0,4 x 19 mm	302200	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance™ - 30G 1/2'' 0,3 x 13 mm	304000	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotomklinge	R35 207500005	Feather Safety Razor, Osaka (JPN)
Mullkompresse Gazin®	18501	Lohmann & Rauscher, Neuwied
Mundschutz	1826	3M, Neuss
Objektträger Super Frost Plus	03-0060	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger	ISO 8037/1	R. Langenbrinck, Emmendingen

OP-Haube	84000	Farstar medical, Barsbüttel
PapPen	H-4000	Vector Labs, Peterborough (UK)
Pasteurpipetten - 3,2 ml	EA65.1	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen Cellstar	628160	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen - 10 µl	70.1115	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen - 200 µl	70.760.002	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen - 200 µl	0030.000.870	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen - 1000 µl	686290	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen - 15 ml	188271	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen - 50 ml	352070	Becton Dickinson, Heidelberg
Precellys ceramic Beads - 1,4 mm	91-PCS-CK14P	Peqlab, Erlangen
Precellys Deckel	91-PCS-TC	Peqlab, Erlangen
Precellys Homogenisationsröhrchen 2 ml	91-PCS-TV	Peqlab, Erlangen
Reaction Tubes - 1,5 ml	616201	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäß Multi TapTop Tubes - 1,5 ml	E518.1	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße RNSase-frei, Multi Safe Seal Tubes - 1,5 ml	7080.1	Carl Roth, Karlsruhe
Rundbodenröhrchen-Falcon™ 5 ml	352052	Becton Dickinson, Heidelberg

S-Monovetten® 2,7 ml	05.1167	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen-Plastipak™ - 1 ml	300013	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen Injekt - 2 ml	4606027V	B Braun, Melsungen
Spritzen Injekt - 5 ml	4606051V	B Braun, Melsungen
Spritzen Injekt - 10 ml	4606108V	B Braun, Melsungen
Stripetten-Falcon® - 1 ml	356521	Becton Dickinson, Heidelberg
Stripetten-Falcon® - 5 ml	356543	Becton Dickinson, Heidelberg
Stripetten-Falcon® - 10 ml	356551	Becton Dickinson, Heidelberg
Stripetten-Falcon® - 25 ml	356525	Becton Dickinson, Heidelberg
Transwellplatte - 3 µm 6,5 mm	3472	Corning Incorporated, Wiesbaden
Venenkatheter Insyte™ - 22G	381223	Becton Dickinson, Heidelberg
96-Well PCR-Platte, Multiplate	MLL9601	Bio-Rad Laboratories, München
Zählkammer C-Chip	DHC-N01	Digital Bio, Seoul (ROK)
Zellkulturflaschen	90076	TPP, Trasadingen (CH)
Zellsiebe, Cell Strainer - 70 µm	352350	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.2 Geräte

Absaugpumpe	Vario BVC 210	Vacuubrand, Wertheim)
Brutschrank	Heraeus Oven T6	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	BD FACS CANTO II	Becton Dickinson, Heidelberg
Einbettautomat	Histoembedder EG 1160	Leica Biosystems, Nussloch
Eismaschine (AF10)	AF10	Scotsman, Sprockhoevel
ELISA Microplate Washer	Hydroflex ELISA	Tecan, Grödig (AT)
ELISA Plate Reader	Infinite M200 Pro	Tecan, Grödig (AT)
Gewebeinfiltrationsautomat	TP1020	Leica Biosystems, Wetzlar
Heizplatte	Ikamag RCT	Janke&Kunkel, Staufen
Heizplatte	HI 1220	Leica Biosystems, Nussloch
Homogenisator	Precellys 24	Peqlab, Erlangen
Labor-pH-Meter	526	WTW Wissenschaftlich- Technische Werkstätten Weilheim)
Magnetrührer	Ikamag RCT	Janke&Kunkel, Staufen
Mikroskop	Leica DM IRB	Leica Biosystems, Wetzlar
Multipipette® plus		Eppendorf, Hamburg
Pinzetten	BD312R, BD311R	Aesculap, Tuttlingen
Pipetboy acu	155000	INTEGRA Bioscience, Fernwald
Rotationsmikrotom	RM 2235	Leica Biosystems, Nussloch
Scheren	BC590R, BC060R	Aesculap, Tuttlingen
Thermocycler	MyCycler	Bio-Rad Laboratories, München

Thermal Cycler	C1000 CFX96 Real-time System	Bio-Rad Laboratories, München
Thermoschüttler	AK82	Infors AG, Bottmingen (CH)
Vernebler	Pocket Nebuliser, MicroAIR	Omron, Mannheim
Vortex	K-55-GE	Bender und Hobein AG, Zürich (CH)
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Waage	HR-120	A&D Instruments Ltd., Ahrensburg
Waage	Scout II	Ohaus, Kirchheim
Waage	PK 4800 Delta Range	Mettler, Gießen
Wasserbad	HI 1210	Leica Biosystems, Nussloch
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Perfect Spin P	Peqlab, erlangen

2.1.3 Chemikalien, Medien

Avidin Blocking Kit	SP2001	Vector Labs, Peterborough (UK)
Bluing Reagent	7301	Thermo Scientific, Bonn
BSA, Albumin from bovine serum	A-7906	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
Chloroform	C2432	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
DAB Peroxidase Substrate Tablet Set	D4168	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
Diff-Quick Färbeset	130832	Medion Diagnostics, Düdingen

		(CH)
DPBS without Mg/Ca	D8537	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
EDTA	ED4S	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
Ethanol absolut	A3678	AppliChem, Darmstadt
Eukitt	03989	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
Evans Blue	206334	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
Formaldehyd 4 %	A3697	AppliChem, Darmstadt
Formamid	A2156	AppliChem, Darmstadt
FSGO Gelatin	G7765	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
Immersionsöl	115577	Merck, Darmstadt
LPS	L-6011	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
Methanol	106009	Merck, Darmstadt
NaCl	106404	Merck, Darmstadt
NH ₄ Cl	A0988	AppliChem, Darmstadt
NaHCO ₃	K10720529	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd, PFA	P6148	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
Paraplast Plus	39502004	McCormick Scientific, St. Louis (USA)
PBS-	D-8537	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
peqGold Trifast	30-2020	Peqlab, Erlangen
Sodium azide, NaN ₃	S8032	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
Türks-Lösung	109277	Merck, Darmstadt
Unmasking solution	H3300	Vector Labs, Peterborough (UK)
Wasserstoffperoxid 30 %	108597	Merck, Darmstadt
Xylol	9713.3	Carl roth, Karlsruhe

2.1.4 Antikörper, Enzyme

CD45 PerCP	557235	Becton Dickinson, Heidelberg
Collagenase	C7657	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
DNase	D4527	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
DuoSet ELISA Mouse CXCL1/KC	DY453	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA Mouse CXCL2/MIP-2	DY452	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA Mouse IL-6	DY406	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA Mouse TNF α	DY410	R&D Systems, Wiesbaden
7/4 FITC	MCA 771F	AbD Serotec, Düsseldorf
GR-1	RB6-8C5	Lymphocyte Culture Center core, University of Virginia, Charlottesville (USA)
Hyaluronidase	H3506	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
IgG 2a FITC	553929	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG 2b APC	553991	Becton Dickinson, Heidelberg
Rat Anti-Mouse neutrophils (7/4)	MCA771GA	AbD Serotec, Düsseldorf
Vectastain ABC-Kit (Rat IgG)	PK-4004	Vector Labs, Peterborough (UK)

2.1.5 Medikamente

AMD3100 octahydrochloride hydrate	5 mg Trockensubstanz A-5602	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
CCX771	2 mg/ ml	ChemoCentryx, Mountain View, CA (USA)
Heparin-Natrium	25.000 IE/ 5 ml	Ratiopharm, Ulm
Ketamin	500mg/ 10ml	Ratiopharm, Ulm
NaCl 0,9 %	10 ml	B Braun, Melsungen
Rompun 2 %	25 ml	Bayer, Leverkusen
Softasept	3887138	B Braun, Melsungen

2.1.6 Software, Statistik

FACS Diva, Version 6.1.3	BD FACS CANTO II
Flowjo	Version 7.2.5
Megallan	
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego, CA, USA

2.1.7 Versuchstiere

Wild Typ - Mäuse C ₅₇ Bl/6	Charles River, Sulzfeld
A _{2B} AR-Knock out - Mäuse	Boston University, School of Medicine, Department of Biochemistry (Boston, USA)

Die Versuchstiere wurden maximal zu viert in einem Käfig gehalten und wurden mit Spezialfutter und Wasser versorgt. Im Tierstall herrschte eine Luftfeuchtigkeit von 45 bis 55 %, eine Raumtemperatur von 23°C bis 25°C und es wurde täglich im 12-Stunden- Takt, ein Tag-Nacht-Rhythmus imitiert.

Für alle nachfolgenden beschriebenen Versuche, wurden männliche acht- bis zwölf-Wochen alte Mäuse verwendet. Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Regierungspräsidium Tübingen (Genehmigungsnummer TV-Nummer A6/13).

2.2 Methoden

2.2.1 Induktion der pulmonalen Inflammation - Verneblung von LPS

Für alle nachfolgenden Versuche, wurden die Tiere mit LPS per Inhalation vorbehandelt. Dafür wurde LPS der Salmonella enteritidis-Bakterien verwendet. Die Inhalationslösung bestand aus 7 ml LPS, gelöst in NaCl 0,9 %, mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml. Durch die LPS-Inhalation wurde eine transiente pulmonale Inflammation induziert.

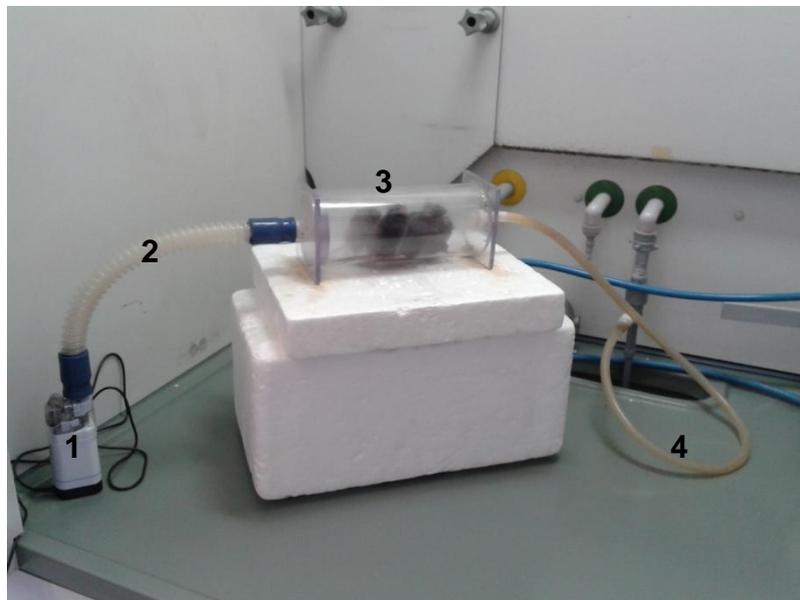


Abbildung 2.1: Inhalationsdurchführung von LPS: 1. Vernebler; 2. Gummischlauch, welcher den Vernebler mit der Inhalationskammer verbindet; 3. Inhalationskammer; 4. Gummischlauch, welcher die Inhalationskammer mit dem Wasserhahn verbindet

Für die Inhalationsdurchführung wurden vier bis maximal acht Mäuse in eine Inhalationskammer (3) gesetzt. Anschließend wurden 7 ml LPS-Lösung in den Vernebler (1) gegeben und dieser wurde mit dem Gummischlauch (2) an die Inhalationskammer angeschlossen. Das andere Ende der Inhalationskammer, wurde mit einem zweiten Gummischlauch (4) mit dem Wasserhahn verbunden. Durch das fließende Wasser wurde ein Sog aufgebaut und dadurch wurde das LPS-Aerosol aus dem Vernebler (1) in die Inhalationskammer geleitet. Dadurch

konnte eine gleichmäßige Verteilung des LPS-Aerosols in der Inhalationskammer und die Luftzufuhr gewährleistet werden. Eine Inhalationsdurchführung dauerte etwa 30 bis 40 Minuten. Die Kontrollgruppen wurden mit 7 ml NaCl 0,9 % vernebelt.

2.2.2 Behandlung mit AMD3100 (CXCR4-Inhibitor)

Der CXCR4-Inhibitor AMD3100 wurde mit der Dosis 5mg/kg Körpergewicht (KG) 60 Minuten vor der LPS-Inhalation der Maus intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Das AMD3100 lag als Trockensubstanz á 5 mg pro Fläschchen vor. Um eine Arbeitslösung mit 5 µg AMD3100 auf 10 µl zu erreichen, wurde die Trockensubstanz mit 1ml NaCl 0,9 % aufgelöst. Diese Lösungssubstanz, mit der Konzentration 50 µg AMD3100/ 10 µl, wurde in Reaction Tubes verteilt (130 µl pro Reaction Tube) und wurde bei -20°C eingefroren. Zum Versuch wurde die eingefrorene Lösungssubstanz aufgetaut und mit 1.170 µl NaCl 0,9% aufgefüllt. Dadurch entstand die Arbeitslösung mit 5 µg AMD3100/ 10 µl.

Pro Gramm (g) Maus wurden 5 µg AMD3100 der Arbeitslösung verabreicht. Den Mäusen in der Kontrollgruppe, wurden 10µl NaCl 0,9 % pro g KG intraperitoneal verabreicht.

2.2.3 Behandlung mit CCX771 (CXCR7-Inhibitor)

Der CCX771-Inhibitor wurde von der Firma ChemoCentryx (ChemoCentryx, Mountain View, CA (USA)) für die Versuchsdurchführung zur Verfügung gestellt. Als Vorgabe durch die Firma ChemoCentryx, wurde der CCX771-Inhibitor mit der Dosis 10mg/kg KG und subcutan (s.c.) appliziert.

Der Inhibitor lag in flüssiger Form vor, mit einer Konzentration von 2 mg/ml. Um eine Arbeitslösung mit der gewünschten Konzentration von 10 µg CCX771/ 10

µl zu erhalten, wurde 1 ml CCX771 mit 1ml NaCl 0,9% verdünnt. Pro Gramm Maus wurden 10 µg CCX771 der Arbeitslösung s.c. injiziert.

2.2.4 Anästhesie

Vor Versuchsbeginn wurde der Versuchsmaus 300µl der folgenden Anästhesielösung i.p. verabreicht und bis zur vollständigen Wirkung ca. 6 Minuten abgewartet.

Anästhesielösung: 750 µl NaCl 0,9 %
 200 µl Ketamin 5 %
 50 µl Rompun 2 %

Die hergestellte Anästhesielösung reichte für drei Tiere.

2.2.5 Migration Neutrophiler Granulozyten in vivo

Mit dem Migrationsversuch soll dargestellt werden, in welchem Ausmaß PMNs aus dem intravasalen Raum ins Lungeninterstitium und in den intraalveolären Raum migrieren. Dazu wurde die Zellzahl in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und in der Lunge bestimmt. Die Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen gelang mittels Antikörper-Färbungen und anschließender Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting , FACS). Auch die Zuordnung zu den einzelnen Kompartimenten, Intravasalraum, Interstitium und Intraalveolarraum, gelang dadurch.

Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden 10 µl des gefärbten Antikörpers (Gr-1-Antikörper) mit 290 µl NaCl 0,9 % (insgesamt 300 µl pro Maus) angesetzt und bis zum Verbrauch in einer Dunkelkammer gelagert. Der Gr-1-Antikörper, markiert mit Allophycocyanin (APC), geht mit den intravasal frei zirkulierenden

PMNs eine Bindung ein und ermöglicht dadurch eine spätere Kompartimentzuordnung der PMNs.

Die BAL- und Lungenentnahme wurde 24 Stunden nach der LPS-Inhalation durchgeführt. Dafür wurde die Maus zur Erweiterung der Schwanzvene für wenige Minuten unter Rotlicht gestellt. Anschließend wurde der Schwanz gründlich mit Softasept desinfiziert und der Maus wurden die 300 µl Antikörperlösung (siehe oben) intravenös (i.v.) verabreicht. Unmittelbar danach wurde das Tier mit 300 µl der Anästhesielösung (siehe Absatz 2.2.4) narkotisiert. Die vollständige Anästhesiewirkung trat nach etwa 6 Minuten ein und dann wurde die Maus, in Rückenlage, auf einem OP-Tisch gelagert und fixiert. Das Fell wurde gründlich desinfiziert und anschließend über einen kleinen Schnitt im Halsbereich, das Fell bis zur Leistenregion abpräpariert. Mit einem Schnitt unterhalb des Xyphoids, wurde das Abdomen und der Thorax eröffnet. Anschließend wurden die großen Bauchgefäße infradiaphragmal durchtrennt und der, noch schlagende, rechte Ventrikel des Herzens mit 3ml Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline (DPBS-) gespült. Dadurch wurden die Lungengefäße von Blut frei gespült und es blieben lediglich die antikörpermarkierten PMNs, welche am Endothel noch anhafteten, zurück. Im nächsten Schritt erfolgte die Freipräparierung der Trachea und mit einer Venenverweilkanüle, als Tubus fungierend, wurde die Trachea intubiert. Um die BAL zu gewinnen, wurde mit einer 1ml-Insulinspritze, die Lunge mit Phosphate-Buffered Saline (PBS-) über den Tubus lavagiert. D.h. es wurde PBS- in die Lunge injiziert und anschließend gleich wieder aspiriert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis 5 ml BAL gesammelt wurden. Die BAL wurde in einem Falcon gesammelt und auf Eis zwischengelagert.

Die gesammelten BALs wurden nun für 10 Minuten, bei 4°C und 1300 revolutions per minute (rpm) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das übriggebliebene Pellet wurde mit 1 ml Färbepuffer resuspendiert.

Färbepuffer:	500 ml	PBS-
	5 g	BSA
	0,5 g	Sodium Acid

Für die Zellzählung wurde, bei den BALs mit LPS-Behandlung, 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Türks-Lösung verdünnt und davon 10 µl auf eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die Zellen ausgezählt. Bei den BALs ohne LPS-Behandlung, wurden 10 µl unverdünnte Zellsuspension mittels der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl wurde in einer Excelltabelle dokumentiert.

Lungenentnahme

Nach der BAL-Gewinnung, wurde die Lunge zusammen mit dem Herz (als Herz-Lungen-Paket) entnommen. Die Lungenlappen wurden hilusnah abpräpariert und in einer Petrischale klein geschnitten. Die kleingeschnittenen Lungenlappen wurden mit dem Enzymcocktail getränkt und ebenfalls in einem Falcon gesammelt. Bis zur Weiterverarbeitung, wurde das Lungenenzymgemisch bei Raumtemperatur (RT) in einer Dunkelkammer gelagert.

Enzymcocktail (pro Maus):	5 ml	PBS-
	5 µl	Hyaluronidase
	5 µl	Collagenase
	5 µl	DNase
	100 µl	Gr-1-AK (ungefärbter Antikörper)

Die Falcons mit dem Lungenenzymgemisch kamen nun für 30 Minuten, bei 37°C und 100 rpm auf den Thermoschüttler. Anschließend wurde das Lungenenzymgemisch auf ein Zellsieb gegeben und mit einem Spritzenstempel durchgesiebt. Während dem Durchsieben wurde fraktioniert mit 20ml PBS- das Lungengewebe gespült. Die aufgefangene Lösung wurde wieder in einem Falcon gesammelt und anschließend für 10 Minuten, bei 4°C und 1300rpm

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das übriggebliebene Pellet wurde mit 5 ml verdünntem Lysepuffer resuspendiert und für 5 Minuten in einer Dunkelkammer inkubiert. Nach den 5 Minuten wurde die Lyse mit 20 ml Färbepuffer (siehe BAL) gestoppt und nochmals für 10 Minuten, bei 4°C und 1300rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals abgekippt und das Pellet wurde nun mit 3 ml Färbepuffer resuspendiert.

Lysepuffer:	10,03g	NH ₄ Cl (1,5M)
	1,05g	NaHCO ₃ (0,1M)
	0,465g	disodium EDTA
	125ml	Aqua bidest

Für die Zellzählung wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Türks-Lösung verdünnt und davon wurden wiederum 10 µl auf die Neubauer Zählkammer pipettiert und die Zellzahl ausgezählt.

Um die Ziel-Endkonzentration von 200.000 Zellen/ 100 µl zu erhalten, wurden die Zellsuspensionen (BAL und Lunge) entweder mit Färbepuffer weiter verdünnt oder durch eine nochmalige Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und erneute Resuspension mit der entsprechenden Menge an Färbepuffer weiter konzentriert.

FACS - Färbung

Für die Zellfärbung mittels Fluoreszenzantikörpern, wurden zunächst in Rundbodenröhrchen, die Antikörper mit Färbepuffer, nach folgendem Verdünnungsschema, verdünnt.

Tabelle 2.1: Verdünnungsschema der Fluoreszenz-Antikörper

	Antikörper (µl)	Färbepuffer (µl)
7/4 FITC (0,1mg/ml)	1	4
CD45 PerCP (0,2mg/ml)	1	9
Gr-1 633 (0,5mg/ml)	1	9
IgG2a FITC (0,5mg/ml)	1	24
IgG2b APC (0,2mg/ml)	1	3

Bei CD45 handelt es sich um einen Oberflächenmarker, der auf Leukozyten exprimiert ist. Der Gr-1 und 7/4 sind Antigene, welche spezifisch für PMNs sind. IgG2a FITC und IgG2b APC sind die korrespondierenden Isotypen.

Von allen BAL- und Lungenproben wurden 100µl in ein Rundbodenröhrchen pipettiert und nach folgendem Schema jeweils 1µl der Antikörperlösungen hinzupipettiert.

	100µl BAL	100µl Lunge	Isotypenkontrolle
7/4 FITC (0,1mg/ml)	x	x	
CD45 PerCP (0,2mg/ml)	x	x	x
Gr-1 633 (0,5mg/ml)	x		
IgG2a FITC (0,5mg/ml)			x
IgG2b APC (0,2mg/ml)			x

Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten, bei 4°C in der Dunkelkammer inkubiert. Nach den 20 Minuten wurde zu jeder Probe 2 ml Färbepuffer dazugeben, um die ungebundenen Antikörper herauszuwaschen. Die Proben wurden für 5 Minuten, bei 4°C und 1300rpm zentrifugiert und der Überstand

wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Nach der zweiten Zentrifugation, wurde zu dem übriggebliebenen Pellet 400µl der Fixierlösung pipettiert.

Fixierung (pro Maus):	200 µl	PFA (4%)
	200 µl	Färbepuffer

Die Proben wurden bis zur Analyse, abgedeckt und im Kühlschrank, unter Lichtausschluss, gelagert.

Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting , FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die quantitative Vermessung und die molekulare Charakterisierung intakter Zellen, nach spezifischen Färbungen. Die Vermessung der Zellen erfolgt durch Lichtstreuung und Fluoreszenzen. In dem Moment, in dem die Zellen einen rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laserstrahl passieren, wird die Zelle vermessen. Hierfür müssen die Zellen in einer Zellsuspension vorliegen. Durch die Streuung des Anregungslichts und die Anregung von fluoreszierenden Markern, können mittels Fluoreszenzsignalen die Zellgröße und die Granularität der Zellen, gleichzeitig bestimmt werden. Von der Menge gebundener Antikörper oder dem nukleären DNA-Gehalt, hängt die Helligkeit der Fluoreszenzsignale ab. Physikalische und molekulare Eigenschaften der Zellen, werden durch verschiedene Sensoren gemessen. Die entsprechenden Lichtsignale werden bei der Analyse der Zelleigenschaften quantifiziert und in einer multiparametrischen Messung für jede Zelle einzeln in einen Datenspeicher geschrieben. In einem weiteren Schritt werden die gespeicherten Messdaten ausgewertet [176].

Bei der Messung werden das Vorwärtsstreulicht und das Seitwärtsstreulicht unterschieden. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter; FSC), bezeichnet die Lichtstreuung der Zellen, welches in einem engen Winkel zum Laserlicht gemessen wird. Es stellt ein unscharfes Maß der Größe von Zellen dar. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter; SSC), bezeichnet die Lichtstreuung der Zellen,

welche im Winkel von 90° zum Laserlicht gemessen wird. Das SSC hängt u.a. von der komplexen Mehrfachstreuung durch intrazelluläre Kompartimente ab und erlaubt Aussagen über die Granularität und der Binnenstruktur der Zellen. Die Signale der Lichtstreuung hängen von der Vorbehandlung der Zellen oder von der Optik der Zelle ab [176].

Die Fluoreszenzintensität, wird ebenfalls im 90°-Winkel zum Laserlicht gemessen, da die Lichtstreuung mit zunehmendem Winkel zum Laserstrahl schwächer wird. Hierfür müssen die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sein. Beim Passieren des Laserstrahls werden die Fluoreszenzsignale der markierten Zellen angeregt und gemessen. Die Fluoreszenzfarbstoffe, welche im Migrationsversuch (siehe oben), verwendet wurden, zeigen Überlappungen in ihren Emmissionsspektren. Zellen, welche nur mit einem Farbstoff markiert wurden, können ebenfalls Mischsignale auf zwei Detektoren aufweisen. Daher ist eine rechnerische Kompensation von Messdaten, vor der Speicherung, erforderlich. Ist die rechnerische Kompensation nicht mehr möglich, kann noch die manuelle Kompensation durchgeführt werden. Hier werden die unkompensierten Messdaten gespeichert und mittels einer Software korrigiert.[176]

Auswertung

Die Messung der Proben erfolgte am BD FACS CANTO II (FACS Diva Version 6.1.3). Bei jeder Probe wurden 10.000 Zellen analysiert und anschließend wurden die Daten mithilfe der Flowjo-Software (Flowjo, Version 7.2.5) ausgewertet.

2.2.6 Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität mittels Evans Blue

Evans Blue ist ein blauer Farbstoff, der eine hohe Bindungsaffinität zu Albumin besitzt. Albumin ist aufgrund seiner Molekülgröße unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage, Gefäßendothel zu durchdringen. Bei der akuten pulmonalen Inflammation jedoch, kommt es zu einer Endothelschädigung der Lungengefäße und folgedessen zur Permeabilitätserhöhung. Das Albumin mit dem gebundenen Evans Blue kann nun das Endothel der Lungengefäße durchdringen und somit ins Lungeninterstitium übertreten und dort nachgewiesen werden. Je höher die Konzentration von Evans Blue im Lungeninterstitium ist, desto ausgeprägter ist die Endothelschädigung der Lungengefäße.

Durchführung

Der Versuch wurde 5,5 Stunden nach der LPS- bzw. NaCl 0,9 %-Inhalation durchgeführt. Zu Beginn wurde der Evans Blue-Farbstoff mit NaCl 0,9 % gelöst. Um die Endkonzentration von 1 mg/ml zu erhalten, wurde 1mg Evans Blue in 1 ml NaCl 0,9 % gelöst. Der Versuchsmäusen wurden 20 µg Evans Blue pro Gramm KG verabreicht, d.h. eine 20 g schwere Versuchsmaus erhielt 400 µg gelöstes Evans Blue.

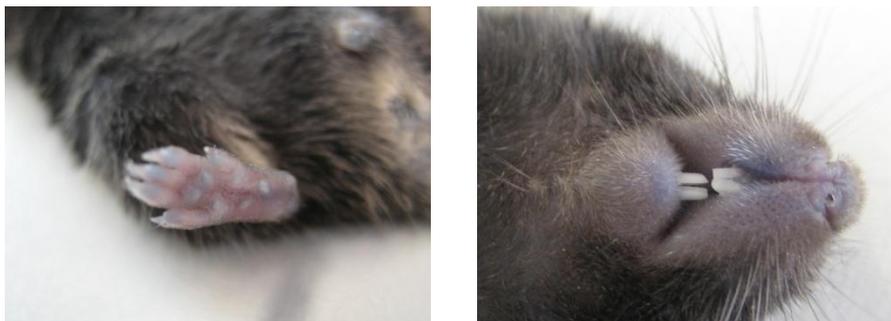


Abbildung 2.2: Blaufärbung der Akren nach der Evans Blue-i.v.-Injektion

5,5 Stunden nach der Verneblung, wurde die Maus zur Erweiterung der Schwanzvene für wenige Minuten unter Rotlicht gestellt. Nach Gründlicher Desinfektion des Schwanzes, wurde die vorbereitete Evans Blue Lösung i.v. injiziert und 30 Minuten wirken gelassen. Sechs Minuten vor Ablauf der 30 Minuten, wurde die Maus mit 300 µl der Anästhesielösung (siehe 2.2.4) narkotisiert. Die anästhesierte Maus wurde in Rückenlage auf dem OP-Tisch gelagert und die Extremitäten fixiert. Nach gründlicher Felldesinfektion, wurde über einen kleinen Schnitt im Halsbereich, das Fell bis zur Leistengegend abpräpariert. Der Thorax und das Abdomen wurden eröffnet. Mit einer vorheparinisierten Insulinspritze wurde der Maus 1ml Blut aus dem schlagenden Herzen entnommen. Das abgenommene heparinisierte Blut wurde in ein Reaction Tube gegeben und auf Eis, bis zur Weiterverarbeitung, zwischengelagert.

Das gewonnene heparinisierte Blut wurde nun für 15 Minuten, bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation, wurde das überstehende Plasma in ein neues Reaction Tube pipettiert. und für 12-18 Stunden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Nach der Blutentnahme wurden die großen Bauchgefäße infradiaphragmal durchtrennt und das noch schlagende Herz über den rechten Ventrikel mit DPBS- perfundiert, bis sich die Lunge blutleer darstellte. Dadurch wurden die Lungengefäße vom intravasalen Blut freigespült. Anschließend wurde die Lunge zusammen mit dem Herz, als Herz-Lungen-Paket, entnommen und die Lungenlappen wurden, von den mediastinalen Anatomiestrukturen, hilusnah separiert. Die Lunge wurde gewogen und mit der 3,5-fachen Menge PBS- versetzt und mit dem Precellys24 homogenisiert. Die homogenisierte Lungenprobe wurde mit Formamid versetzt, um dadurch das Evans Blue aus der Albuminbindung zu lösen. Das Verhältnis Lungenprobe zu Formamid betrug 1:2. Es wurden 450 µl homogenisiertes Lungengewebe mit 900 µl Formamid in ein Rundbodenröhrchen pipettiert und anschließend die Lungenprobe abgedeckt für 12-18 Stunden, bei 60°C, inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lungenprobe für 30 Minuten, bei RT und 5.000 rpm

zentrifugiert. Vom Überstand wurden je 200 µl als Triplikate in eine 96-well-Platte pipittiert. Das Plasma wurde mit PBS-, im Verhältnis 1:5, verdünnt und ebenfalls je 200 µl als Triplikate in die 96-well-Platte pipittiert.

Für die Herstellung einer Standardreihe, wurde der Evans Blue-Rest vom Vortag mit PBS- verdünnt. Es wurden sechs unterschiedliche Verdünnungskonzentrationen erstellt, welche ebenfalls als Triplikate in die 96-well-Platte pipittiert wurden (200 µl/well).

Evans Blue-Konzentrationen der Standardreihe:

1. 20 µg/ 200 µl
2. 10 µg/ 200 µl
3. 5 µg/ 200 µl
4. 2,5 µg/ 200 µl
5. 1,25 µg/ 200 µl
6. 0 µg/ 200 µl

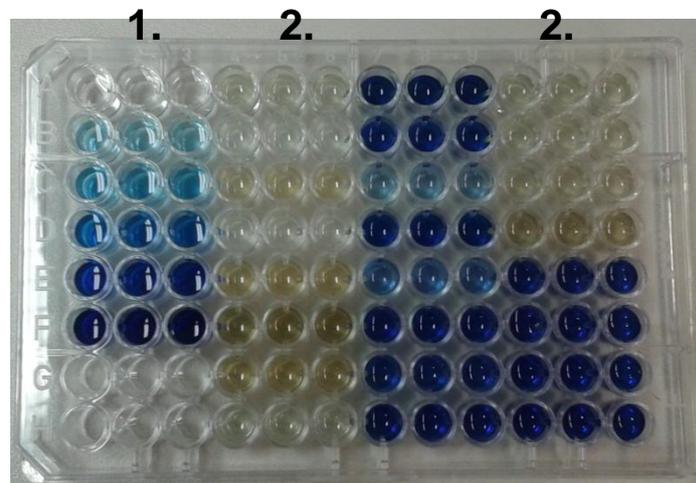


Abbildung 2.3: 96-well-Platte nach Pipettierung; 1. Standardreihe als Triplikate; 2. Plasma- und Lungenproben als Triplikate

Am Spectrophotometer (Photometer GENios, Tecan) wurde die Absorption bei 620 nm und 740 nm der Plasma- und Lungenproben gemessen. Das Absorptionsmaximum von Evans Blue liegt bei 620nm. Konnte bei 740 nm keine Absorption gemessen werden, wies dies auf eine Kontamination mit Hämpigmenten der Proben hin. Die korrekte Absorption von Evans Blue in den Plasma- und Lungengewebe bei 620nm, wurde nach folgender Gleichung kalkuliert:

Korrekte Absorption bei 620 nm = Gemessene Absorption bei 620 nm - [1,426 x (Absorption bei 740 nm) + 0,03]

Die Auswertung erfolgte anschließend mit der Magellan-Software. Mit der Auswertung konnte der relative Evans Blue-Gehalt der Lungenproben errechnet werden (μg Evans Blue/ g Lungengewebe).

2.2.7 ELISA

Das Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gehört zu den Verfahren der Immunoassays und wurde in den 1970er Jahren an der Universität Stockholm in Schweden entwickelt [177]. Mit diesem Verfahren können Antigene in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Grundlage besteht in der Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei entweder das Antigen oder der Antikörper mit einem Enzym markiert ist. Die Enzyme Meerrettichperoxidase und alkalische Phosphatase werden am häufigsten beim ELISA-Verfahren verwendet. Verwendet man die Enzyme zusammen mit chromogenen Substraten, katalysieren die Enzyme Reaktionen, welche mit Farbänderungen sichtbar werden [150].

Double-Antibody-Sandwich ELISA

Die Zytokinbestimmung in der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Double-Antibody-Sandwich ELISA-Verfahren durchgeführt. Das zu bestimmende Antigen befindet sich dabei in Lösung (hier in der BAL) und der Antikörper ist an einer festen Phase (hier eine 96-Well-Mikrotiterplatte) gebunden. Für die

Testdurchführung werden zwei Antikörper benötigt, die beide spezifisch mit dem Antigen reagieren. Der erste Antikörper wird als Primär- bzw. als Coating-Antikörper bezeichnet und ist an die Mikrotiterplatte gebunden. Durch die Zugabe der Lösung (BAL), welche analysiert werden soll, kommt es zur Bindung zwischen den in der BAL enthaltenen Antigenen und dem Coating-Antikörper. Im Anschluss an die Inkubationszeit, wird die Mikrotiterplatte gewaschen, um die ungebundenen Antigene zu entfernen und folgedessen wird der Sekundärantikörper bzw. Detection-Antikörper, welcher mit einem Enzym gekoppelt ist, der Mikrotiterplatte zugegeben. Es kommt zur Bindung zwischen des Detection-Antikörpers und dem Coating-Antikörper-Antigen-Komplex. Das bedeutet, dass das gesuchte Antigen nun zwischen den beiden Antikörpern gebunden ist. Nach der Inkubationszeit, wird die Platte erneut gewaschen und anschließend ein Substrat dazugegeben. Das Substrat wird nun durch das gekoppelte Enzym am Detection-Antikörper umgesetzt. Im Anschluss erfolgt die photometrische Messung am Spectrometer. Um eine quantitative Messung zu erhalten, wird die Messung gegen eine Standardreihe durchgeführt [150, 178].

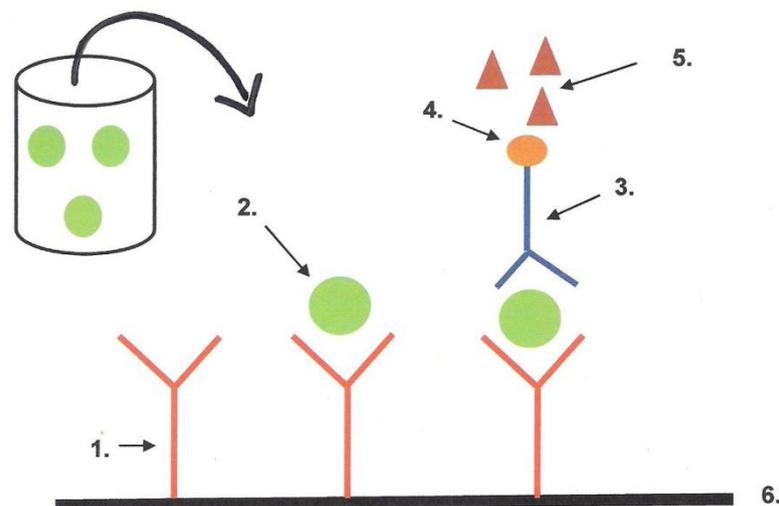


Abbildung 2.4: Prinzip der Double-Antibody-Sandwich ELISA; 1. Coating-Antikörper gebunden an der 96-Well-Mikrotiterplatte (6.), 2. gesuchtes Antigen, welches mittels einer Lösung zum Coating-Antikörper dazugegeben wird, 3. Detection-Antikörper, 4. gekoppeltes Enzym, 5. Substrat. Modifiziert nach [150].

Bestimmung von CXCL1 (KC), CXCL2/3 (MIP-2), TNF- α und IL-6 in der BAL

Die BAL-Gewinnung erfolgte 3 Stunden nach der LPS- bzw. NaCl 0,9 %-Inhalation und wurde analog zum Vorgehen unter Punkt 2.2.5 durchgeführt. Die Gewinnung der BAL-Proben erfolgte mittels eiskaltem PBS- und es wurden exakt 2 ml BAL pro Versuchstier lavagiert und in Rundbodenröhrchen gegeben. Bis zur Weiterverarbeitung, wurden diese auf Eis gelagert. Nach der BAL-Gewinnung wurden die Proben für 10 Minuten, bei 4°C und 1.300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in vorgekühlte (bei -20°C) Reaction Tubes pipettiert und bis zur ELISA-Durchführung wurden die Proben bei -80°C eingefroren. Für die Bestimmung der Zytokine, wurden die BAL-Proben mit NaCl 0,9 %-Inhalation unverdünnt verwendet und die BAL-Proben mit LPS-Inhalation 1:8 verdünnt. Die ELISA-Analyse (DuoSet ELISA Development System) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe der Magellan-Software.

2.2.8 Immunhistochemie

Organentnahme

Die Organentnahme für die Histologie, erfolgte 24 Stunden nach Inhalation von LPS bzw. NaCl 0,9 %. Vor Versuchsbeginn wurde eine Perfusorspritze mit einem Schlauchsystem am Stativ gerichtet. Die Perfusorspritze wurde mit 4%igen Formalin befüllt. Nach der Vorbereitung, wurde das Versuchstier narkotisiert, in Rückenlage auf dem OP-Tisch gelagert und die Extremitäten fixiert. Das Fell wurde gründlich desinfiziert und über einen kleinen Hautschnitt im Halsbereich, bis zur Leistenregion abpräpariert. Es erfolgte die Eröffnung des Thorax und des Abdomens, die großen Bauchgefäße wurden infradiaphragmal durchgetrennt und anschließend wurde das noch schlagende Herz, über den rechten Ventrikel, mit DPBS- perfundiert. Nach der Herzperfusion erfolgte die Freipräparierung der Trachea, welche mit einer Venenverweilkanüle, als Tubus fungierend, intubiert wurde. Nun wurde das, vorher gerichtete und entlüftete Schlauchsystem mit Formalin an den Tubus

angeschlossen und das Formalin wurde für 10-15 Minuten passiv, mittels hydrostatischem Druck, in die Lunge infundiert. Zusätzlich wurde die Lunge mit einem, in Formalin getränkten, Tupfer abgedeckt und feucht gehalten. Anschließend wurde die rechte Lunge, zusammen mit den anatomischen Nachbarstrukturen (Trachea, Bronchialbaum, Ösophagus) und die linke Lunge separat entnommen und je in eine Einbettkassette gelegt. Die gesammelten Einbettkassetten wurden in Formalin 4 % eingelegt und für 18 bis 24 Stunden in Formalin belassen.

Einbetten der Lunge in Paraffin

Am folgenden Tag wurden die Einbettkassetten mit 70%igen Ethanol ab gespült und in den Gewebeeinfiltrationsautomaten (Leica) gegeben. Hier durchlief die Probe in mehreren Stationen eine mehrstündige Entwässerung und Paraffinierung. Die Entwässerung wurde durch die immer höher werdende Ethanolkonzentration bewirkt.

Folgende Stationen durchlief die Probe:

Station 1 und 2:	70 % Ethanol	1x 90 Minuten; 1x 60 Minuten
Station 3 und 4:	96 % Ethanol	1x 90 Minuten; 1x 60 Minuten
Station 5 und 6:	100 % Ethanol	1x 90 Minuten; 1x 60 Minuten
Station 7:	100 % Ethanol	60 Minuten
Station 8 bis 10:	Xylol	2x 90 Minuten; 1x 60 Minuten
Paraffinierung		3x 90 Minuten

Die paraffinierten Lungenproben wurden am Einbettautomat in Blöckchen gegossen, welche später am Mikrotom geschnitten wurden.

Anfertigung der Schnitte

Um bessere Schnitteigenschaften am Mikrotom zu erzielen, wurden die Paraffinblöckchen auf Eis gekühlt. Aus den gekühlten Paraffinblöckchen wurden Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt, welche vorsichtig mit einem Pinsel ins Wasserbad gegeben wurden. Nach wenigen Minuten wurden die

Schnitte, mit Hilfe eines Objektträgers in 37°C warmes Aqua dest gegeben. Hier konnten die Schnitte sich entfalten. Anschließend wurden jeweils drei angefertigte Schnitte auf einen Objektträger gezogen und Dieser wurde über Nacht auf der Wärmeplatte bei 42°C getrocknet.

Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert und rehydriert. Dafür durchliefen die Schnitte mehrere Stationen, diesmal mit absteigender Konzentration des Ethanols.

- 3x 5 Minuten Xylol
- 2x 5 Minuten 100 % Ethanol
- 2x 5 Minuten 95 % Ethanol
- 1x 5 Minuten 70 % Ethanol
- 1x 5 Minuten 50 % Ethanol und
- 2x 5 Minuten Aqua dest

Anschließend wurden die Objektträger für 30 Minuten in der Lösung aus 200 ml Methanol und 3 ml 30 %igen Wasserstoffperoxid (H₂O₂) inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (RT) und diente zum blocken der endogenen Peroxidase. Auf die Inkubation folgte die 5 minütige Spülung mit Aqua dest und die Überführung in ein hitzebeständiges Gefäß. Hier wurde der Objektträger mit Unmasking Solution bedeckt und in der Mikrowelle für 20 Minuten, bei 600W erwärmt. In regelmäßigen Zeitabständen, ca. alle vier bis fünf Minuten, wurde der Flüssigkeitsbestand im Gefäß überprüft. Um eine Austrocknung zu verhindern, wurde ggf. die Flüssigkeit im Gefäß aufgefüllt. Nach dem Erhitzen wurde der Objektträger ca. eine Stunde abgekühlt. Der abgekühlte Objektträger wurde anschließend für 5 Minuten mit PBS- gespült und die Schnitte wurden mit dem PapPen eingekreist. Die Fettkreise sollten später dass Ineinanderlaufen der Antikörperlösungen verhindern. Innerhalb dieser Fettkreise wurden die Schnitte mit je 100 µl Avidin Blocking Solution bedeckt und für eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert.

Avidin Blocking Solution (für einen Objektträger):

- 1 ml FSGO 0,5% in PBS-
- 100µl Normal Rabbit Serum (NRS)
- 4 Tropfen Avidin Blocking Solution

Nach 60 Minuten wurde die Avidin Blocking Solution abgekippt und der Objektträger wurde erneut für 5 Minuten mit PBS- gespült. Nun wurde auf dem Objektträger der Primär-Antikörper (Biotin Blocking Solution) aufgetragen und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Biotin Blocking Solution (für einen Objektträger):

- 1 ml FSGO 0,5% in PBS-
- 100 µl NRS
- 4 Tropfen Biotin Blocking Solution
- 1 µl Primär-Antikörper (1 µg/ml)

Am nächsten Morgen wurde der Primär-Antikörper abgekippt und für 5 Minuten mit Fish Skin Gelatin Oil 0,5 % (FSGO 0,5%) gespült. Anschließend wurde der Sekundär-AK auf die Schnitte aufgetragen und in der feuchten Kammer für eine Stunde bei RT inkubiert.

Sekundär-AK-Lösung (für einen Objektträger):

- 10 µl Sekundär-AK
- 1 ml FSGO 0,5% in PBS-
- 100 µl NRS

Der Sekundär-AK wurde nach der Inkubationszeit abgekippt , der Objektträger wurde nochmals für 5 Minuten mit FSGO 0,5 % gespült und anschließend wurde die Avidin-Biotin-Complex (ABC) -Solution auf die Schnitte aufgetragen. Die ABC-Solution wurde nach Herstellerangaben mit 4 ml PBS-, 80 µl Solution A und 80 µl Solution B hergestellt. Nach der Eindeckung mit der ABC-Solution erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei RT. Die ABC-Solution wurde abgekippte, der Objektträger wurde 5 Minuten mit PBS- gespült und schließlich

wurde auf die Schnitte die Diaminobenzidin (DAB)-Solution aufgetragen. Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation.

DAB-Solution:

- 1 ml Nukleotidfreies Wasser (NFW)
- 1 Tbl. DAB
- 1 Tbl. H₂O₂

Nach der Inkubation wurde die DAB-Solution abgekippt, anschließend wurde der Objektträger für 5 Minuten mit Aqua dest gespült und schließlich für 15 Sekunden in Hämatoxylin gegengefärbt. Es erfolgt eine 4-5 minütige Spülung unter fließendem Leitungswasser und anschließend wurden die Schnitte für eine Minute mit Bluing Reagent gebläut und erneut für 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Mittels der aufsteigenden Ethanolkonzentration und Xylol wurden die Schnitte wieder entwässert und zuletzt wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

2.2.9 Statistische Auswertung

Mit Hilfe der Graph Pad Prism 5.0 Software (GraphPad Software, San Diego, CA,USA) erfolgte die statistische Auswertung der erhobenen Daten. Die Datenangaben erfolgten als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Eine Signifikanz bestand bei einem Wert von $p < 0,05$. Die Analyse wurde mit einem ein One-Way ANOVA-Test und ein Bonferroni post-hoc Test durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Migration Neutrophiler Granulozyten in vivo

Das Migrationsverhalten Neutrophiler Granulozyten zeigt die quantitative PMN - Verteilung in der akuten pulmonalen Inflammation in den drei verschiedenen Lungenkompartimenten Intravasal (IV), Interstitiell (IS) und Alveolär (BAL).

3.1.1 Dosisermittlung AMD3100 (CXCR4-Inhibitor)

Zu Beginn der ersten Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die optimale Dosis des CXCR4-Inhibitors AMD3100 ermittelt. Es wurden die Dosierungen 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG miteinander verglichen. Dafür wurden beide Dosierungen eine Stunde vor der LPS-Inhalation intraperitoneal appliziert und anschließend die Migration der PMNs in Intravasalraum (IV), Interstitium (IS) und Alveolarraum (BAL) untersucht. Die Dosisermittlung wurde an Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6 durchgeführt. Abbildung 3.1 zeigt, dass die Anzahl der PMNs im Intravasalraum (Abb. 3.1, A) bei der Verwendung von AMD3100 5 mg/kg KG und AMD3100 10 mg/kg KG gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant vermindert ist. Im Interstitium (Abb.3.1, B) zeigt sich in der mit 5mg/kg KG sowie in der mit 10mg/kg KG AMD3100-behandelten Gruppe eine signifikant verminderte Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe (Kontrolle: $5,0 \pm 1,3 \times 10^6$; AMD3100 5mg/kg KG: $3,0 \pm 0,9 \times 10^6$; AMD3100 10mg/kg KG: $3,0 \pm 1,2 \times 10^6$; $p < 0,05$). Im Alveolarraum (Abb.3.1, C) zeigt sich in der mit AMD3100 5mg/kg KG behandelten Gruppe eine signifikante Verminderung der PMN-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe. Auch die Verwendung von AMD3100 10mg/kg KG hemmt die PMN-Migration im Alveolarraum gegenüber der Kontrollgruppe (Kontrolle: $2,4 \pm 1,0 \times 10^6$; AMD3100 5mg/kg KG: $1,3 \pm 0,3 \times 10^6$; AMD3100 10mg/kg KG: $1,3 \pm 0,3 \times 10^6$; $p < 0,05$). Zwischen den beiden Dosierungen ergaben sich keine relevanten Unterschiede, sodass alle weiteren Versuche mit einer Dosierung von 5 mg/kg durchgeführt wurden.

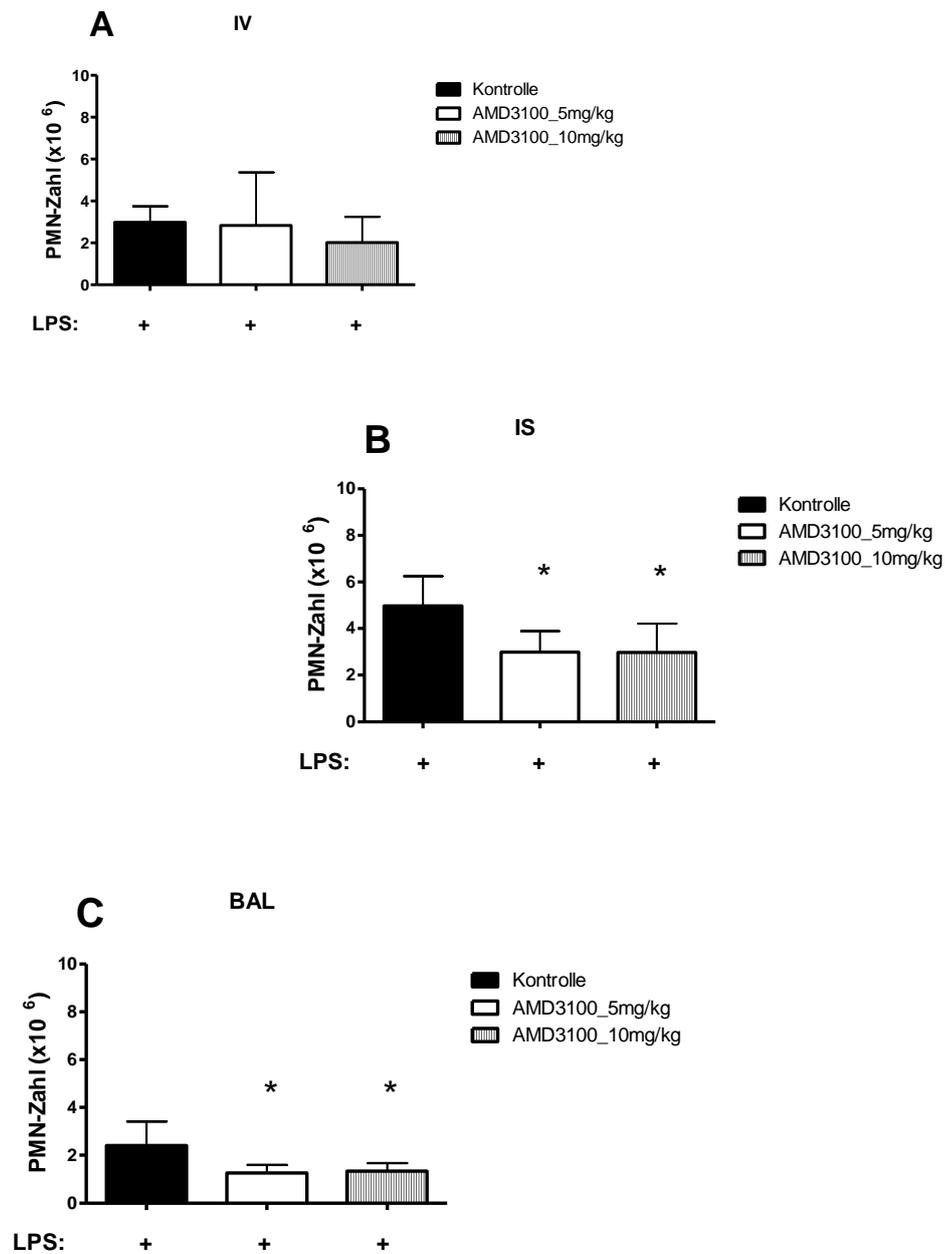


Abbildung 3.1: Migration Neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der AMD3100-Dosierung. Anreicherung Neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach der LPS-Inhalation. AMD3100 wurde 1h vor der LPS-Inhalation appliziert. A: Ansammlung der PMNs im Intravasalraum (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), C: Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 6$). * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe. Modifiziert nach [179].

3.1.2 CXCR4-Inhibition zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Da die bisherige AMD3100-Applikation eine Stunde vor der LPS-Inhalation durchgeführt wurde, wurde im Anschluss an die Dosisermittlung der CXCR4-Inhibitor noch zu weiteren Zeitpunkten appliziert und die PMN-Migration untersucht. Hiermit sollte untersucht werden, ob es weitere mögliche Behandlungszeitpunkte gibt. Es wurden die Applikationszeiten eine Stunde vor der LPS-Inhalation, drei, sechs und zwölf Stunden nach der LPS-Inhalation miteinander verglichen (Abbildung 3.2). Die Versuchsdurchführung erfolgte an Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Die Ergebnisse zeigen, dass im Intrasalraum die PMN-Zahl bei behandelten Tieren zu keinem Zeitpunkt der Applikation signifikant vermindert ist gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 3.2; A). Im Interstitium (Abb. 3.2; B) zeigt sich bei der Applikation eine Stunde vor der LPS-Inhalation und sechs Stunden nach der Inhalation eine signifikant verminderte Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe (Kontrolle: $5,2 \pm 0,7 \times 10^6$; 1h vor LPS: $2,8 \pm 1,4 \times 10^6$; 6h nach LPS: $3,3 \pm 0,9 \times 10^6$; $p < 0,05$). In der BAL (Abb. 3.2; C) zeigt die eine Stunde vor LPS-Inhalation behandelte Gruppe eine signifikante Zellzahlverminderung gegenüber der Kontrollgruppe (Kontrolle: $2,3 \pm 0,4 \times 10^6$; 1h vor LPS: $1,7 \pm 0,3 \times 10^6$; $p < 0,05$). Aufgrund dieser Ergebnisse, wurde der CXCR4-Inhibitor AMD3100 für alle weiteren Versuchsdurchführungen eine Stunde vor der LPS-Inhalation appliziert.

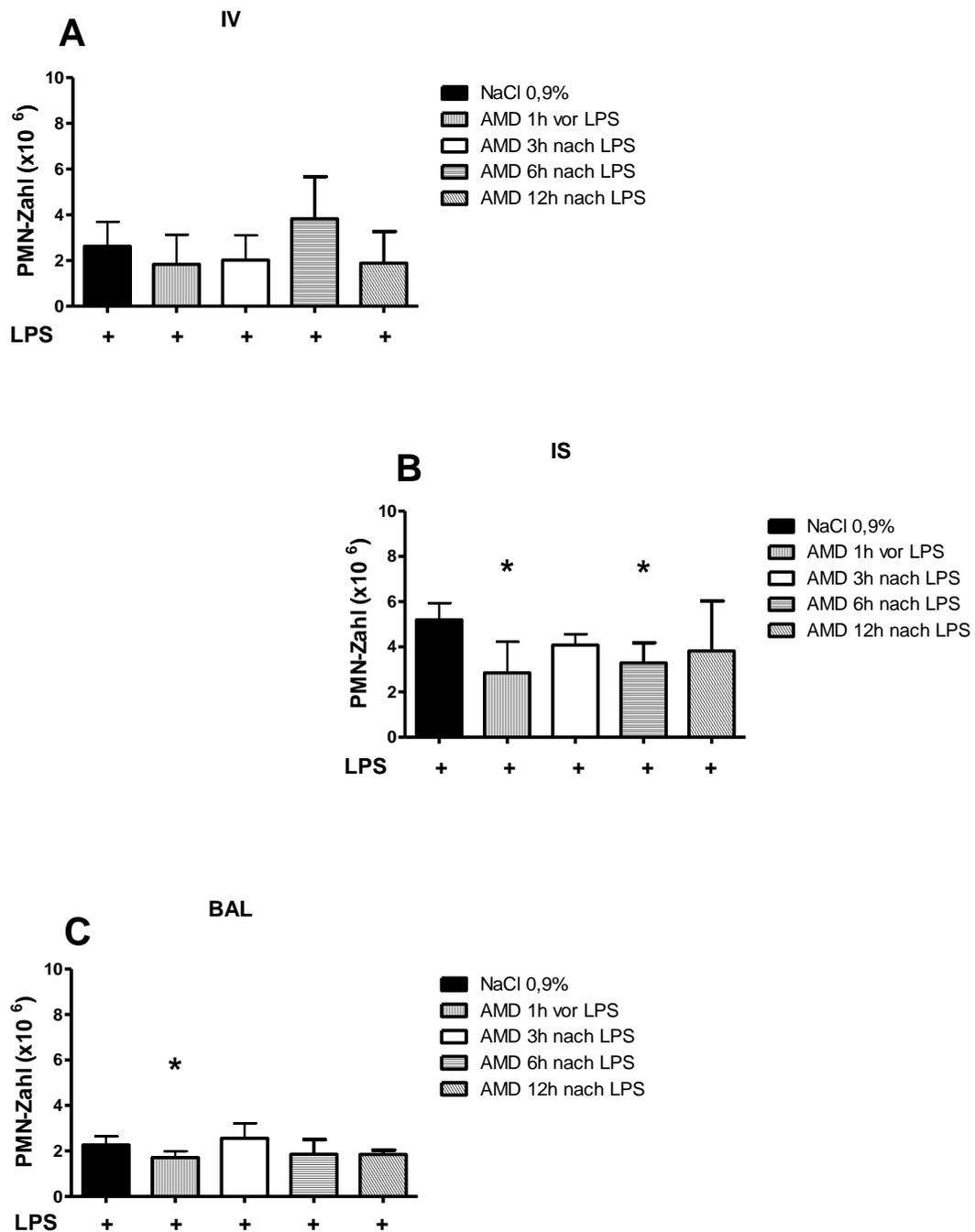


Abbildung 3.2: CXCR4-Inhibition zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Anreicherung Neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach der LPS-Inhalation. AMD3100 wurde eine Stunde vor und drei, sechs und zwölf Stunden nach der LPS-Inhalation appliziert. A: Ansammlung der PMNs im Intravasalraum (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), C: Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n \geq 5). *p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe. Modifiziert nach [179].

3.1.3 CXCR7-Inhibition zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Um den optimalen Behandlungszeitpunkt des CXCR7-Inhibitors CCX771 herauszufinden, wurde auch CCX771 zu unterschiedlichen Zeitpunkten appliziert und die Migration Neutrophiler Granulozyten untersucht und miteinander verglichen. Hierfür wurde CCX771 mit einer Dosis von 10 mg/kg KG entweder vierundzwanzig Stunden und direkt vor, vierundzwanzig Stunden vor, direkt vor, oder direkt nach der LPS-Inhalation verabreicht. Die Durchführung erfolgte an Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Abbildung 3.3 zeigt, dass im Intravasalraum (Abb. 3.3; A) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen besteht. Auch im Interstitium (Abb. 3.3; B) besteht in den einzelnen Gruppen keine Zellzahlverminderung gegenüber der Kontrollgruppe. In der BAL (Abb. 3.3; C) besteht in der direkt vor und direkt nach LPS-Inhalation behandelten Gruppe eine signifikante Verminderung der PMNs gegenüber der Kontrollgruppe (Kontrolle: $1,8 \pm 0,4 \times 10^6$; direkt vor LPS: $1,2 \pm 0,3 \times 10^6$; direkt nach LPS: $1,2 \pm 0,2 \times 10^6$; $p < 0,05$). Da sich die PMN-Zellzahl in den beiden Gruppen direkt vor und direkt nach der LPS-Inhalation nicht signifikant unterscheiden, wurden alle weiteren Versuche mit dem Zeitpunkt direkt nach LPS-Inhalation durchgeführt. Wir entschieden uns für diesen Zeitpunkt, da mit Hinblick auf den klinischen Alltag eine postexpositionelle Therapie als sinnvoll erscheint.

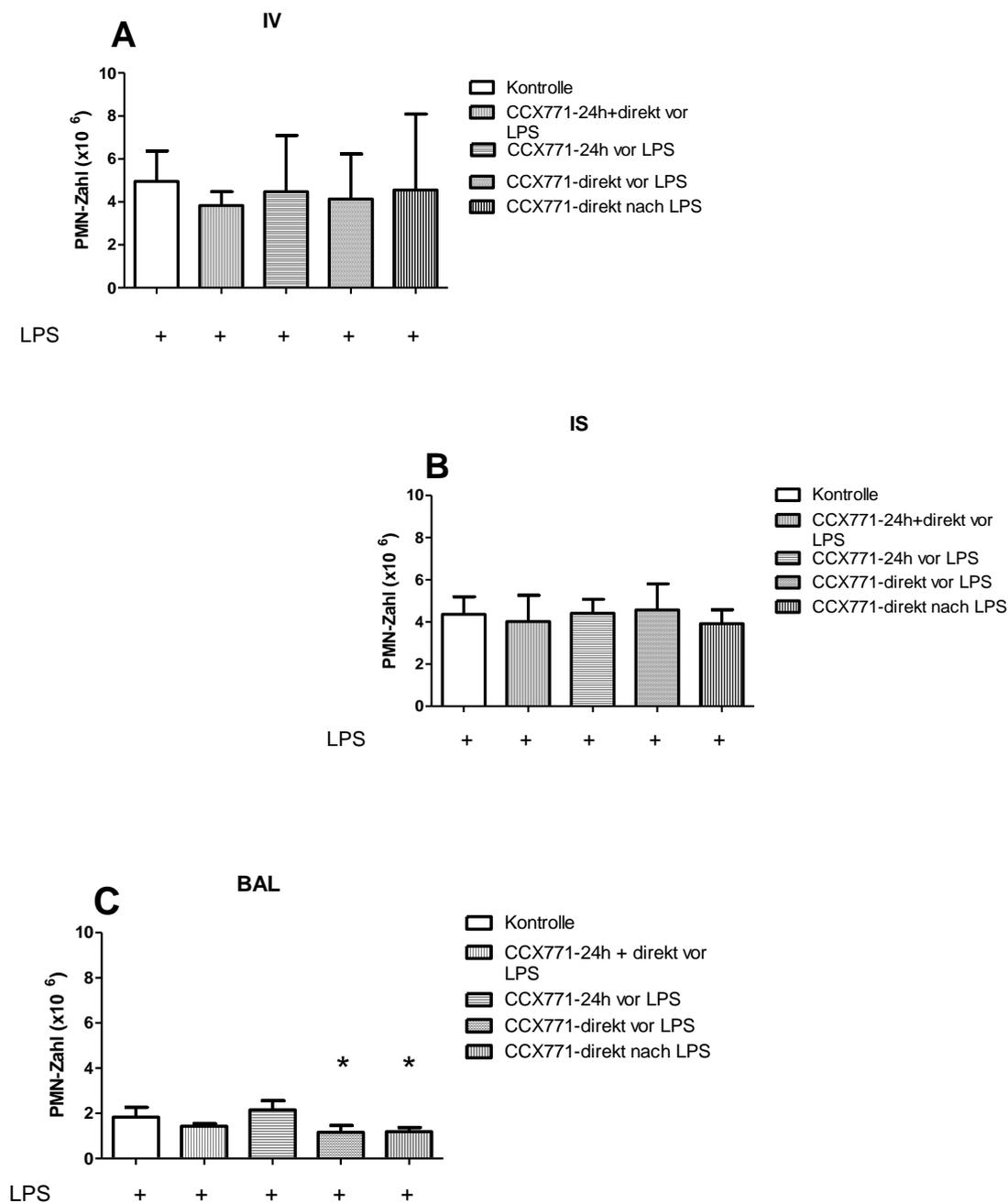


Abbildung 3.3: CXCR7-Inhibition zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Anreicherung Neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach der LPS-Inhalation. CCX771 wurde 24h plus direkt vor, 24h vor, direkt vor und direkt nach der LPS-Inhalation verabreicht. A: Ansammlung der PMNs im Intravasalraum (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), C: Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 4$). * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe. Modifiziert nach [179].

3.1.4 Migration Neutrophiler Granulozyten nach der CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6

Im Anschluss an die Ermittlung der optimalen Dosierung und des optimalen Behandlungszeitpunktes, wurde die Wirkung von AMD3100 und CCX771 auf die PMN-Migration in die unterschiedlichen Lungenkompartimente mit und ohne inflammatorischen Stimulus untersucht. Hierfür wurden beide Inhibitoren jeweils einzeln appliziert und im Vergleich dazu zusammen. Abbildung 3.4 zeigt die Migration Neutrophiler Granulozyten nach der CXCR4-Inhibition mit AMD3100. Abbildung 3.4, A zeigt, dass im Intravasalraum die LPS-Inhalation in der Kontrollgruppe zu einer signifikanten Erhöhung Neutrophiler Granulozyten führt. Die PMN-Zellzahl ist in der mit AMD3100-behandelten Gruppe bereits ohne inflammatorischen Stimulus signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. Auch zeigt sich Intravasal ein signifikanter Anstieg der Zellzahl bei den mit AMD3100-behandelten Tieren mit LPS gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. Es kommt Intravasal zu keinem signifikanten Unterschied der PMN-Zellzahl zwischen der Kontrollgruppe mit LPS und der mit AMD3100-behandelten Gruppe mit LPS (Kontrolle -LPS: $1,1 \pm 0,6 \times 10^6$; Kontrolle +LPS: $4,0 \pm 1,7 \times 10^6$; AMD3100 -LPS: $6,4 \pm 1,7 \times 10^6$; AMD3100 +LPS: $4,6 \pm 2,7 \times 10^6$; $p < 0,05$). Im Interstitium (Abb. 3.4, B) kommt es in der Kontrollgruppe nach LPS-Inhalation ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der PMN-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. Bei der mit AMD3100-behandelten Gruppe ohne LPS zeigt sich interstitiell keine Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS. Die interstitiellen PMN-Zahlen AMD3100-behandelter Tiere zeigen sich nach LPS-Inhalation signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe (Kontrolle -LPS: $0,7 \pm 0,1 \times 10^6$; Kontrolle +LPS: $4,6 \pm 1,2 \times 10^6$; AMD3100 -LPS: $0,8 \pm 1,2 \times 10^6$; AMD3100 +LPS: $3,0 \pm 1,0 \times 10^6$; $p < 0,05$). Auch in der BAL (Abb 3.4, C) kommt es in der Kontrollgruppe durch LPS-Inhalation zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl. Eine solche Zellzahlerhöhung nach LPS-Inhalation lässt sich auch in der AMD3100 behandelten Gruppe feststellen, wobei die Anzahl der PMNs im Alveolarraum nach Stimulation durch LPS in der AMD3100-behandelten Gruppe signifikant niedriger ist als in der Kontrollgruppe (Kontrolle -LPS: $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$; Kontrolle

+LPS: $2,4 \pm 0,8 \times 10^6$; AMD3100 -LPS: $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$; AMD +LPS: $1,2 \pm 0,4 \times 10^6$; $p < 0,05$).

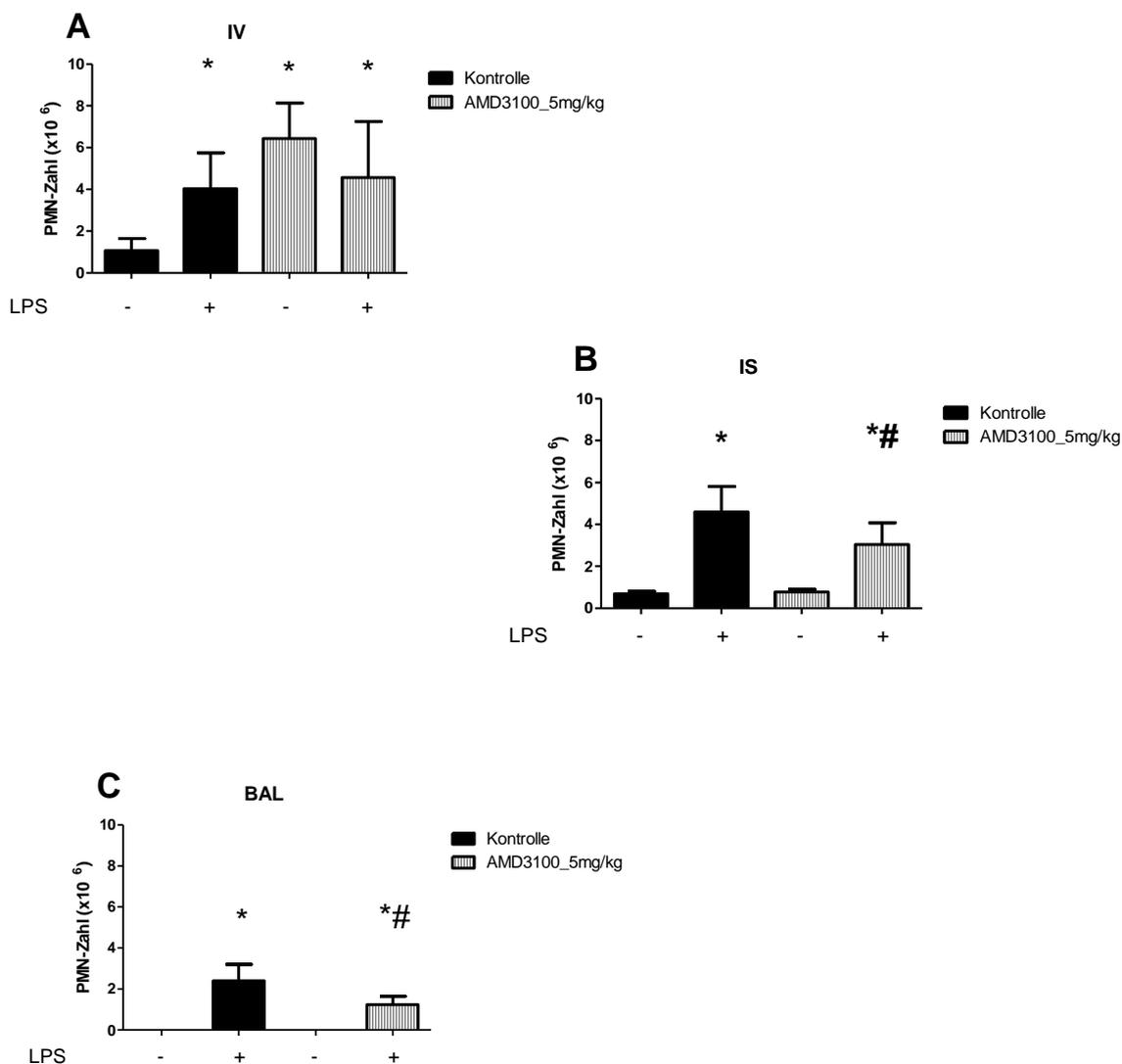


Abbildung 3.4: Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR4-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Anreicherung Neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach der LPS-Inhalation. AMD3100 wurde eine Stunde vor Inhalation appliziert. A: Ansammlung der PMNs im Intravasalraum (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), C: Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 4$). * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. # $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. Modifiziert nach [179].

Die Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR7-Inhibition mit CCX771 ist in Abbildung 3.5 dargestellt. CCX771 wurde direkt nach der LPS-Inhalation appliziert. Im Intrasalraum (Abb. 3.5, A) kommt es in der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der PMN-Zahl nach der LPS-Inhalation. Auch die CCX771-behandelte Gruppe zeigt nach der LPS-Inhalation einen signifikanten Anstieg der PMN-Zahl gegenüber der mit CCX771-behandelten Gruppe ohne LPS. Die PMN-Zellzahl der CCX771-behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe unterscheiden sich nach LPS-Inhalation nicht signifikant (Kontrolle -LPS: $3,5 \pm 1,3 \times 10^6$; Kontrolle +LPS: $6,5 \pm 3,4 \times 10^6$; CCX771 -LPS: $1,3 \pm 0,2 \times 10^6$; CCX771 +LPS: $4,2 \pm 1,0 \times 10^6$; $p < 0,05$). Im Interstitium (Abb. 3.5, B) zeigt sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der CCX771-behandelten Gruppe nach Stimulation mit LPS ein signifikanter Anstieg der PMN-Zellzahl, wobei sich die Zellzahlen nicht signifikant unterscheiden (Kontrolle -LPS: $0,5 \pm 0,0 \times 10^6$; Kontrolle +LPS: $4,5 \pm 1,1 \times 10^6$; CCX 771 -LPS: $0,5 \pm 0,1 \times 10^6$; CCX771 +LPS: $4,4 \pm 1,3 \times 10^6$; $p < 0,05$). In Abbildung 3.5, C ist auch im Alveolarraum ein signifikanter Anstieg der PMN-Zahl in der Kontrollgruppe mit LPS gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS zu beobachten. In der CCX771-behandelten Gruppe mit LPS zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Zellzahl gegenüber der CCX771-behandelten Gruppe ohne LPS. Die PMN-Zellzahl in der CCX771-behandelten Gruppe mit LPS ist signifikant vermindert gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS (Kontrolle -LPS: $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$; Kontrolle +LPS: $2,4 \pm 0,7 \times 10^6$; CCX771 -LPS: $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$; CCX771 +LPS: $1,5 \pm 0,2 \times 10^6$; $p < 0,05$).

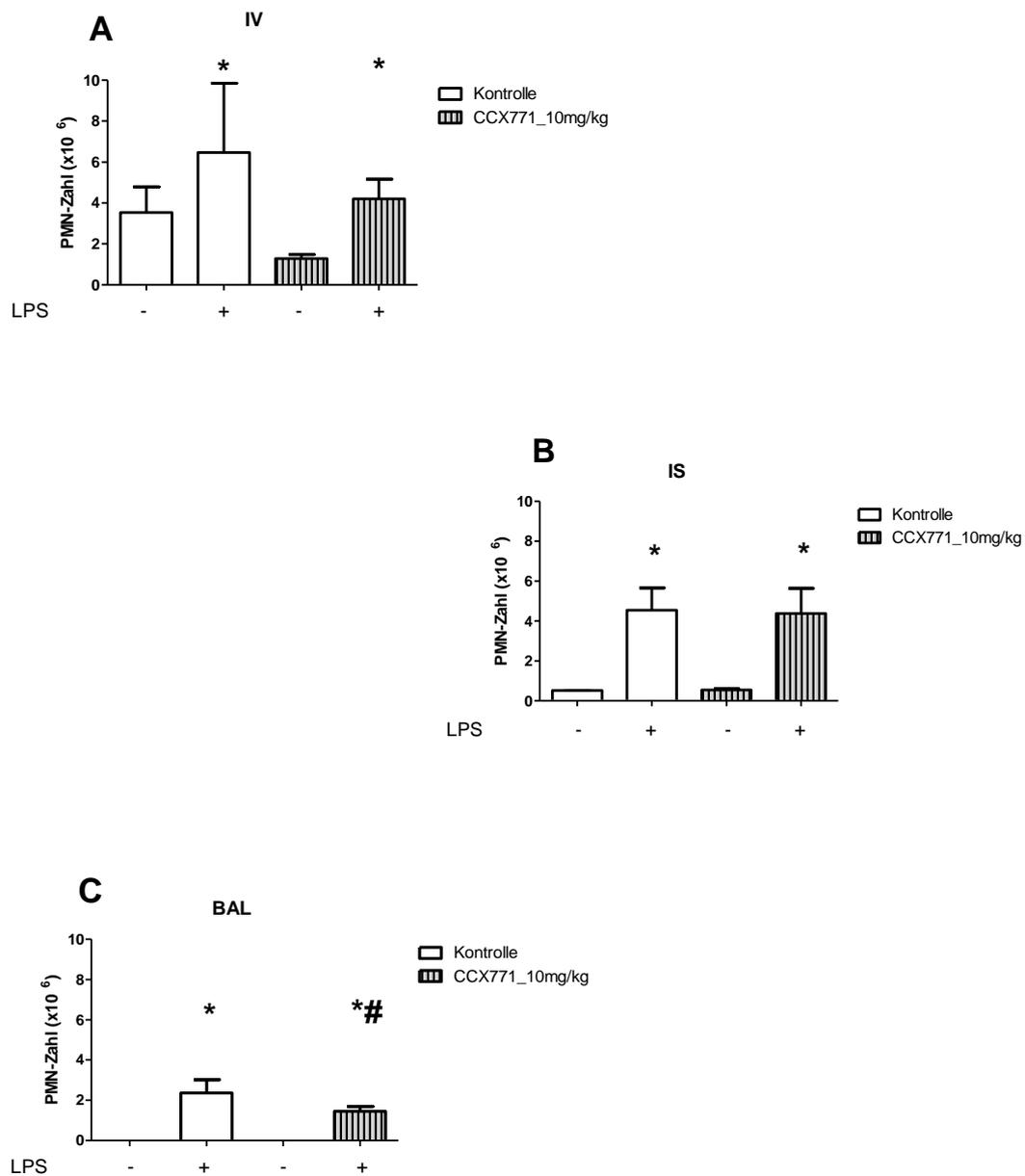


Abbildung 3.5: Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Anreicherung Neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach der LPS-Inhalation. CCX771 wurde direkt nach der LPS-Inhalation verabreicht. A: Ansammlung der PMNs im Intravasalraum (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 4$). * $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. # $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. Modifiziert nach [179].

Nachdem der AMD3100- und CCX771-Inhibitor jeweils einzeln appliziert wurde und daraufhin die Migration Neutrophiler Granulozyten in die unterschiedlichen Lungenkompartimente untersucht wurde, wurde anschließend die CXCR4- und CXCR7-Inhibition kombiniert durchgeführt und die Migration der PMN-Zellen untersucht. Das Ergebnis der Migration der PMNs nach der kombinierten Rezeptorinhibition ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Intravasal (Abb. 3.6, A) kommt es in der AMD3100+CCX771 behandelten Gruppe mit LPS zu einer signifikanten Verminderung der PMN-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS (Kontrolle +LPS: $5,9 \pm 1,2 \times 10^6$; AMD3100+CCX771 +LPS: $3,6 \pm 2,7 \times 10^6$; $p < 0,05$). Im Interstitium (Abb. 3.6, B) führt die LPS-Inhalation in der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der PMN-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. In der AMD3100+CCX771-behandelten Versuchsgruppe kommt es ebenfalls nach der LPS-Inhalation zu einem signifikanten Anstieg der PMN-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS und gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. Auch im Interstitium kommt es nach der Kombinationsbehandlung mit inflammatorischen Stimulus zu einer signifikanten Abnahme der PMN-Zellen gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS (Kontrolle -LPS: $1,1 \pm 0,3 \times 10^6$; Kontrolle +LPS: $7,8 \pm 2,4 \times 10^6$; AMD3100+CCX771 -LPS: $0,3 \pm 0,2 \times 10^6$; AMD3100+CCX771 +LPS: $5,2 \pm 0,6 \times 10^6$; $p < 0,05$). Im Alveolarraum (Abb. 3.6, C) führt die LPS-Inhalation in der Kontrollgruppe auch zu einer signifikanten Erhöhung der PMNs gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. In der AMD3100+CCX771-behandelten Gruppe zeigt sich nach LPS-Inhalation ebenfalls eine signifikante Erhöhung der PMNs gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS und gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. Die PMN-Zahlen in der BAL nach LPS-Inhalation sind jedoch nach der kombinierten Applikation beider Inhibitoren gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS signifikant reduziert (Kontrolle -LPS: $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$; Kontrolle +LPS: $3,5 \pm 0,9 \times 10^6$; AMD3100+CCX771 -LPS: $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$; AMD3100+CCX771 +LPS: $2,4 \pm 0,5 \times 10^6$; $p < 0,05$).

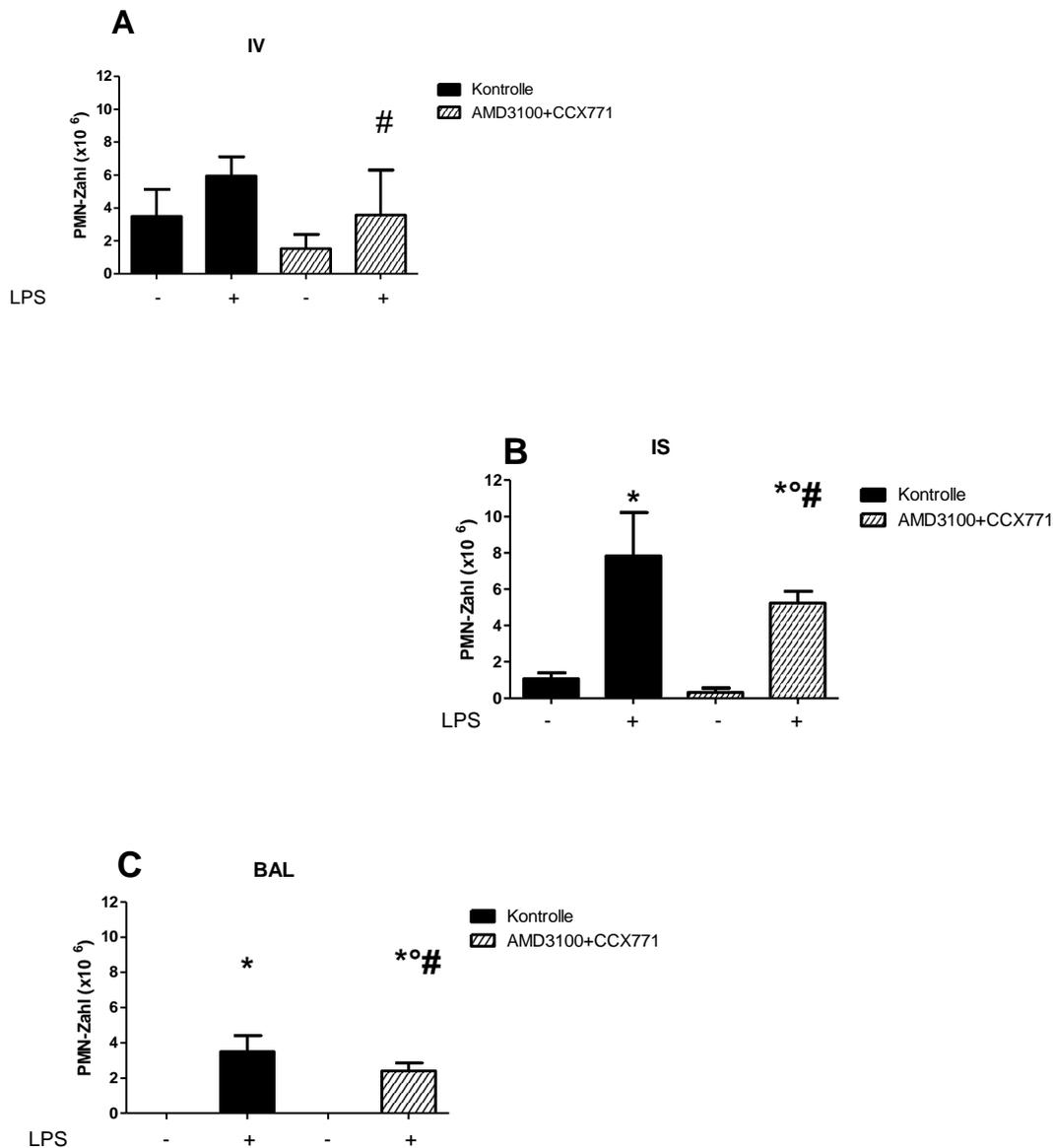


Abbildung 3.6: Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6: Anreicherung Neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach der LPS-Inhalation. AMD3100 wurde eine Stunde vor und CCX771 wurde direkt nach der LPS-Inhalation verabreicht. A: Ansammlung der PMNs im Intravasalraum (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), C: Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 4$). * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. ° $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. # $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. Modifiziert nach [179].

3.1.5 Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR4- und CXCR7- Inhibition in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen

Analog zu 3.1.4 wurde die CXCR4-Inhibition mit AMD3100 und die CXCR7-Inhibition mit CCX771-Inhibitor an $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen durchgeführt und anschließend die Migration Neutrophiler Granulozyten in die verschiedenen Lungenkompartimente untersucht. Abbildung 3.7 zeigt die Ergebnisse der PMN-Migration nach AMD3100-Applikation. Im Intravasalraum (Abb. 3.7, A) führt die Verabreichung von AMD3100 in der Versuchsgruppe ohne inflammatorischen Stimulus zu einer signifikanten Erhöhung der PMN-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS (Kontrolle -LPS: $2,4 \pm 0,4 \times 10^6$; AMD3100 -LPS: $5,3 \pm 2,1 \times 10^6$; $p < 0,05$). Im Interstitium (Abb. 3.7, B) führt die LPS-Inhalation in der Kontrollgruppe zur signifikanten Erhöhung der PMN-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. Interstitiell zeigt sich in der AMD3100-behandelten Versuchsgruppe durch LPS ein signifikanter Anstieg der PMN-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS und gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS (Kontrolle -LPS: $1,2 \pm 0,4 \times 10^6$; Kontrolle +LPS: $4,3 \pm 2,1 \times 10^6$; AMD3100 -LPS: $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$; AMD3100 +LPS: $5,0 \pm 0,8 \times 10^6$; $p < 0,05$). Im Alveolarraum (Abb. 3.7, C) führt die LPS-Inhalation in der Kontrollgruppe ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg Neutrophiler Granulozyten gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. Nach Applikation von AMD3100 und einem inflammatorischen Stimulus zeigt sich eine signifikante Erhöhung der PMN-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS und gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS (Kontrolle -LPS: $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$; Kontrolle +LPS: $2,1 \pm 0,4 \times 10^6$; AMD3100 -LPS: $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$; AMD3100 +LPS: $2,4 \pm 0,3 \times 10^6$; $p < 0,05$).

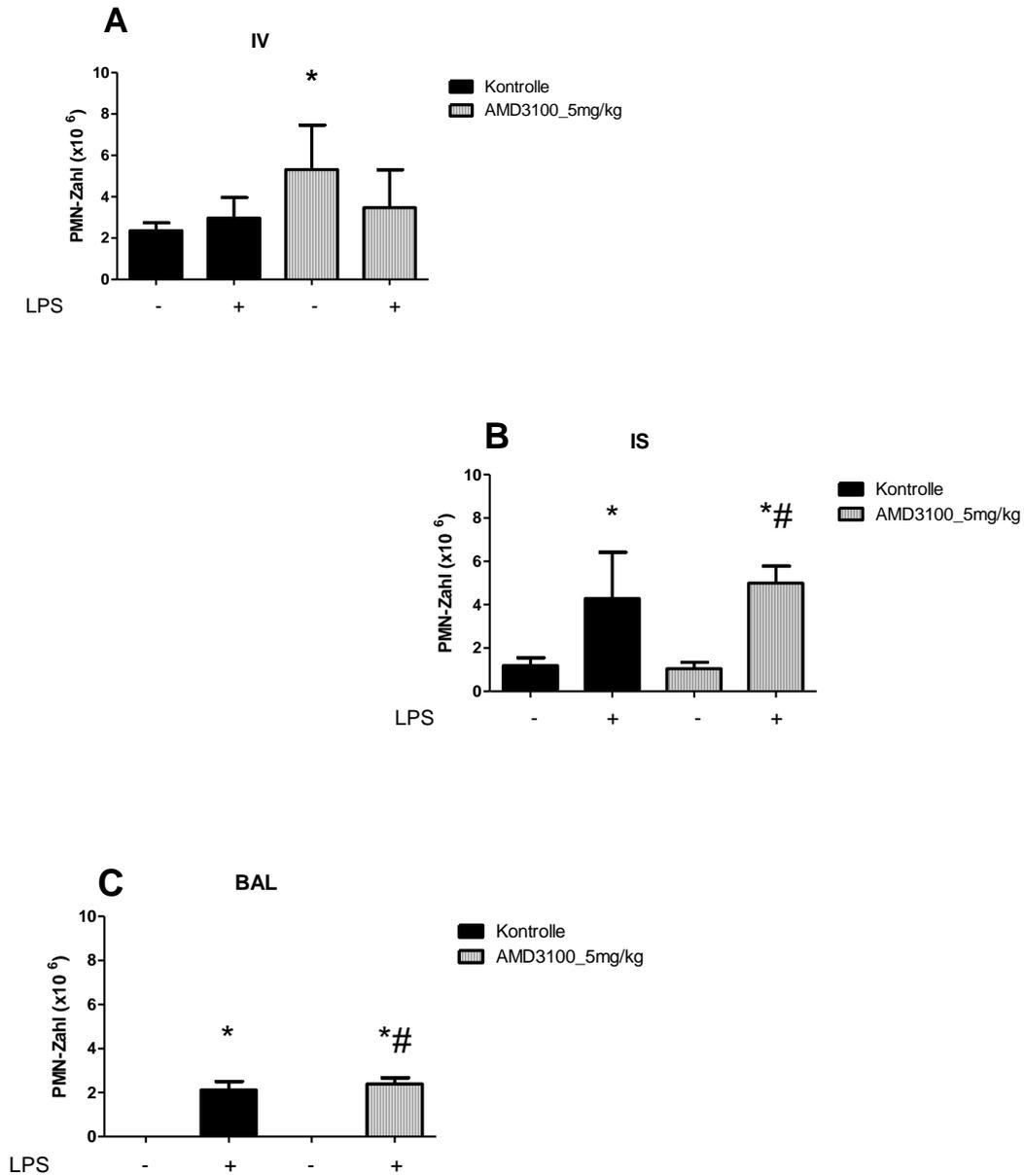


Abbildung 3.7: Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR4-Inhibition in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen: Anreicherung Neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach der LPS-Inhalation. AMD3100 wurde eine Stunde vor der LPS-Inhalation appliziert. A: Ansammlung der PMNs im Intravasalraum (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), C: Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 4$). * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. # $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. Modifiziert nach [179].

Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse der Migration Neutrophiler Granulozyten nach der CXCR7-Inhibition mit CCX771 in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen. Im Intravasalraum (Abb. 3.8, A) zeigen die unterschiedlich behandelten Gruppen keine signifikanten Veränderungen nach Stimulation mit LPS. Im Interstitium (Abb.3.8, B) führt die inflammatorische Stimulation in der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der PMNs gegenüber der Kontrollgruppe ohne inflammatorischen Stimulus. In der CCX771-behandelten Versuchsgruppe kommt es nach Inhalation von LPS ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der PMN-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS und gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. Die CCX771-behandelte Gruppe mit LPS zeigt keine signifikante Reduktion der PMNs gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS (Kontrolle -LPS: $0,8 \pm 0,6 \times 10^6$; Kontrolle +LPS: $4,0 \pm 1,6 \times 10^6$; CCX771 -LPS: $1,0 \pm 0,2 \times 10^6$; CCX771 +LPS: $3,4 \pm 1,1 \times 10^6$; $p < 0,05$). Auch im Alveolarraum (Abb. 3.8, C) führt die LPS-Inhalation in beiden Gruppen zu einer signifikanten Erhöhung der PMN-Zahl gegenüber der Kontrollgruppe sowie der zugehörigen Gruppe ohne LPS. Die CCX771-Behandlung nach LPS-Inhalation führt in der BAL zu keiner signifikanten Reduktion der PMNs gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS (Kontrolle -LPS: $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$; Kontrolle +LPS: $2,5 \pm 0,8 \times 10^6$; CCX771 -LPS: $0,0 \pm 0,0 \times 10^6$; CCX771 +LPS: $1,9 \pm 0,5 \times 10^6$; $p < 0,05$).

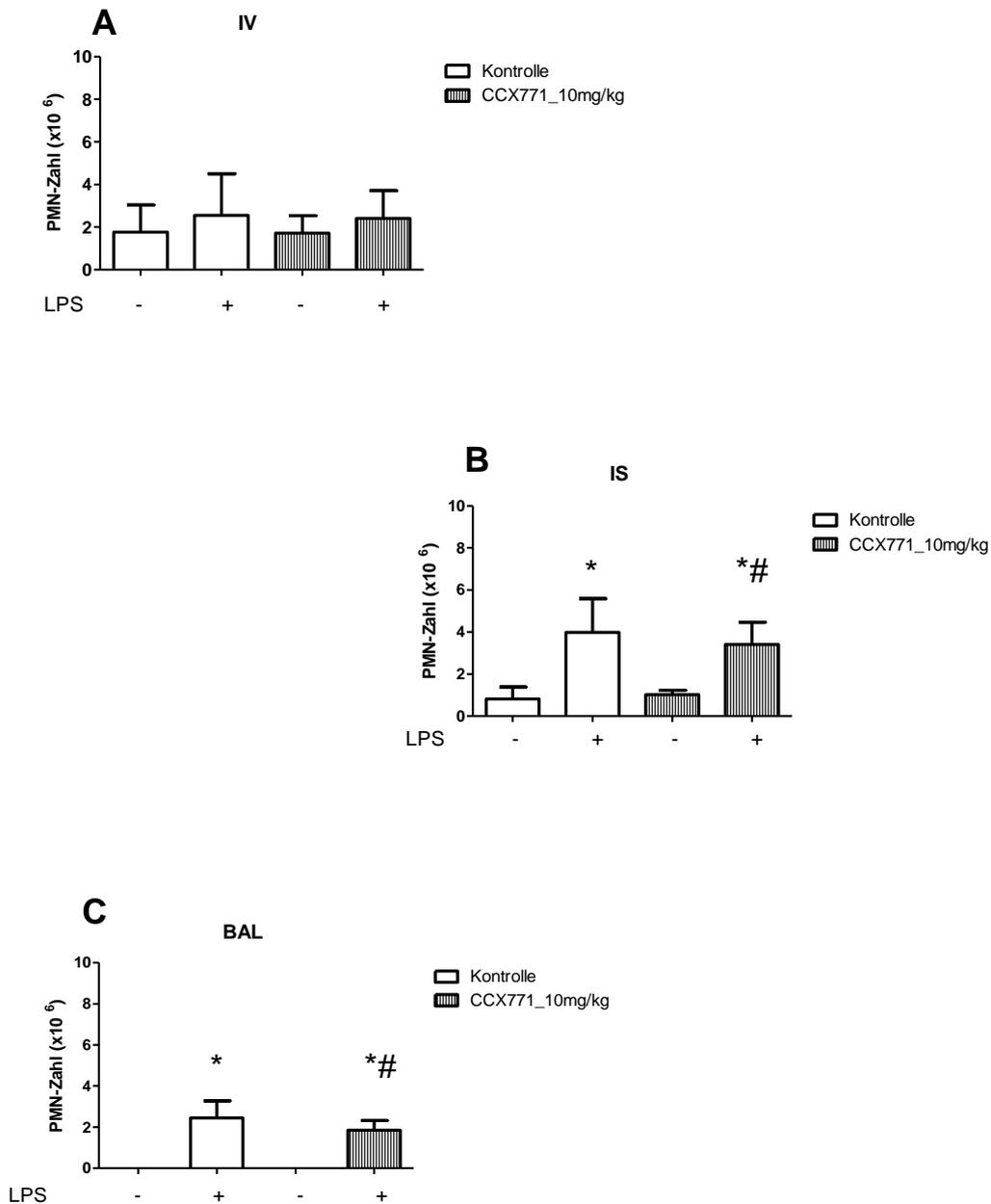


Abbildung 3.8: Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR7-Inhibition in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen: Anreicherung Neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Lungenkompartimenten jeweils 24h nach der LPS-Inhalation. CCX771 wurde direkt nach der LPS-Inhalation appliziert. A: Ansammlung der PMNs im Intravasalraum (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), C: Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 4$). * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. # $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. Modifiziert nach [179].

3.2 Bestimmung der Mikrovaskulären Permeabilität mittels Evans Blue

Wie bereits unter 1.1.5 und 2.2.6 beschrieben, kommt es während einer akuten pulmonalen Inflammation zu einer mikrovaskulären Permeabilitätserhöhung. Die Ausprägung der Permeabilitätserhöhung kann durch die Extravasation des blauen Farbstoffes Evans Blue in das Lungeninterstitium gemessen werden.

Die folgende Abbildung (3.9) zeigt den makroskopischen Vergleich zweier Lungen aus der Kontrollgruppe ohne bzw. mit LPS-Inhalation. Die Lungen wurden sechs Stunden nach der NaCl 0,9 %- bzw. LPS-Inhalation entnommen. Abbildung 3.9, a. zeigt das entnommene Herz-Lungen-Paket aus der Kontrollgruppe ohne LPS. Die Lunge stellt sich nach der Herzperfusion blutleer und weiß dar während die Lunge der Kontrollgruppe mit LPS (Abb. 3.9, b.) sich rot gefärbt darstellt. Es verdeutlicht, dass die Permeabilität des Endothels in der akuten pulmonalen Inflammation deutlich erhöht ist und dadurch die Extravasation der Blutbestandteile ins Lungeninterstitium begünstigt wird.

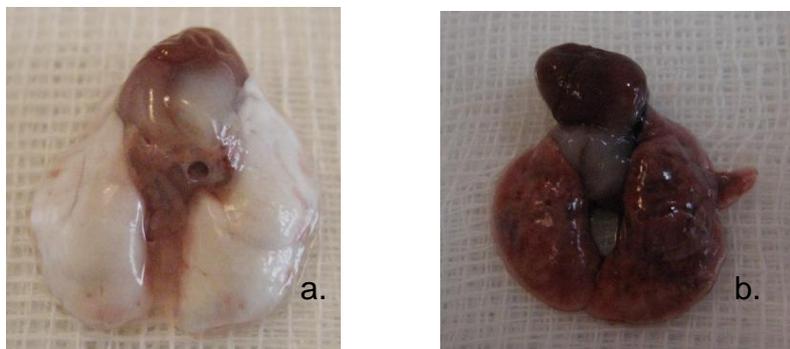


Abbildung 3.9: Makroskopischer Vergleich zweier Lungen nach intravenöser Evans Blue-Injektion: a. Lunge aus der Kontrollgruppe 6h nach der Inhalation mit NaCl 0,9 %, b. Lunge aus der Kontrollgruppe 6h nach der Inhalation mit LPS.

3.2.1 Mikrovaskuläre Permeabilität in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6

Abbildung 3.10 zeigt die quantitative Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität durch Messung des Evans Blue Gehalts im Lungengewebe nach der CXCR4-Inhibition mit AMD3100 in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Die LPS-Inhalation führt in der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg des Evans Blue Gehalts im Lungengewebe gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. Ohne inflammatorischen Stimulus unterscheidet sich der Evans Blue-Gehalt der Lungen von Kontroll- und von AMD3100-behandelten Tieren nicht wesentlich. Auch in der AMD3100-behandelten Gruppe kommt es durch LPS-Inhalation zu einer deutlichen Zunahme des Evans Blue-Gehaltes des Lungengewebes, wobei dieser signifikant niedriger ist als im Lungengewebe von Tieren der Kontrollgruppe nach LPS (Kontrolle -LPS: 45,8 ± 12,7 µg/g; Kontrolle +LPS: 268,5 ± 43,6 µg/g; AMD3100 -LPS: 45,0 ± 19,5 µg/g; AMD3100 +LPS: 156,1 ± 65,8 µg/g; p<0,05).

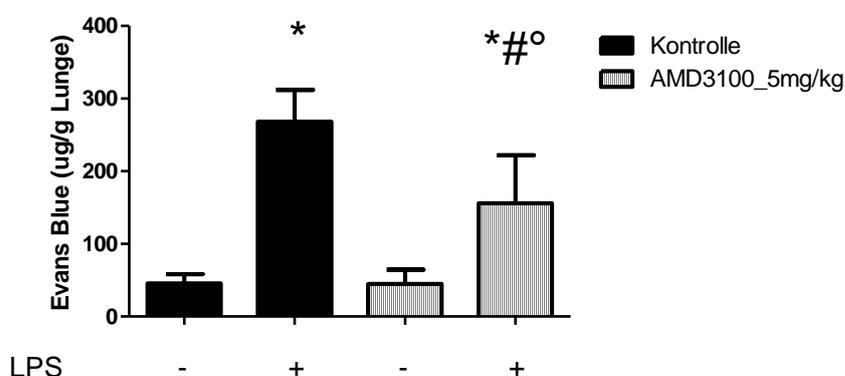


Abbildung 3.10: Einfluss der CXCR4-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Evans Blue-Gehalt im Lungengewebe nach Applikation von AMD3100 im Vergleich zur Kontrollgruppe 6h nach der LPS-Inhalation. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n ≥ 6). *p < 0,05 gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. #p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. °p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. Modifiziert nach [179].

In Abbildung 3.11 ist die quantitative Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität nach CXCR7-Inhibition mit CCX771 in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6 dargestellt. Auch hier führt die inflammatorische Stimulation mit LPS sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der CCX771-behandelten Gruppe zu einem signifikanten Anstieg des Evans Blue Gehalts im Lungengewebe. Die Lungen der mit CCX771-behandelten Tiere zeigen nach der LPS-Inhalation jedoch einen signifikant niedrigeren Evans Blue Gehalt im Lungengewebe als Tiere der Kontrollgruppe mit LPS. Ohne inflammatorischen Stimulus unterscheidet sich der Evans Blue Gehalt der Lungen zwischen Tieren der beiden Gruppen nicht (Kontrolle -LPS: 64,1 ± 17,6 µg/g; Kontrolle +LPS: 283,2 ± 77,2 µg/g; CCX771 -LPS: 38,7 ± 16,4 µg/g; CCX771 +LPS: 121,5 ± 46,5 µg/g; p<0,05).

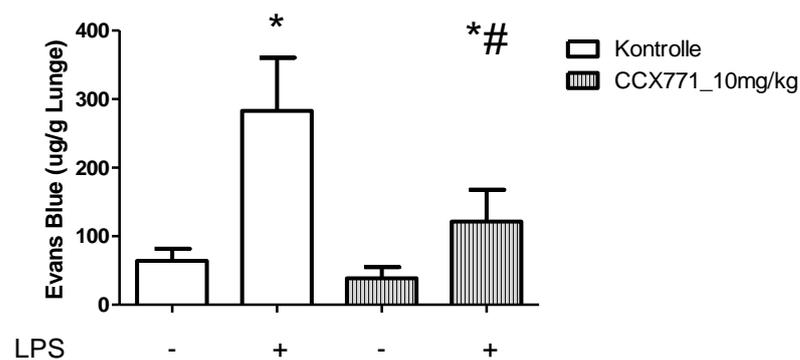


Abbildung 3.11: Einfluss der CXCR7-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Evans Blue-Gehalt im Lungengewebe nach Applikation von CCX771 im Vergleich zur Kontrollgruppe 6h nach der LPS-Inhalation. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n ≥ 6). *p < 0,05 gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. #p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. Modifiziert nach [179]

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität nach der kombinierten Applikation beider Inhibitoren, AMD3100 und CCX771, in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6 werden in der Abbildung 3.12 dargestellt. Die Lungen der Kontrolltiere zeigen nach inflammatorischer Stimulation mit LPS einen signifikant höheren Evans Blue Gehalt im Lungengewebe als die Lungen der Kontrolltiere ohne LPS. Dieser Effekt ist in der AMD3100 und CCX771-behandelten Gruppe nicht zu beobachten. Es lässt sich kein wesentlicher Unterschied im Evans Blue Gehalt der Lungen LPS-stimulierter und unstimulierter Tiere feststellen. Die Lungen der mit AMD3100 und CCX771 behandelten Versuchsgruppe zeigen nach der LPS-Inhalation einen deutlich signifikanten niedrigeren Evans Blue Gehalt im Lungengewebe als Tiere der Kontrollgruppe mit LPS. Ohne inflammatorischen Stimulus unterscheidet sich der Evans Blue Gehalt der Lungen zwischen Tieren der beiden Gruppen nicht (Kontrolle -LPS: 48,4 ± 15,5 µg/g; Kontrolle +LPS: 231,7 ± 88,3 µg/g; AMD3100+CCX771 -LPS: 37,5 ± 11,3 µg/g; AMD3100+CCX771 +LPS: 67,8 ± 24,0 µg/g; p<0,05).

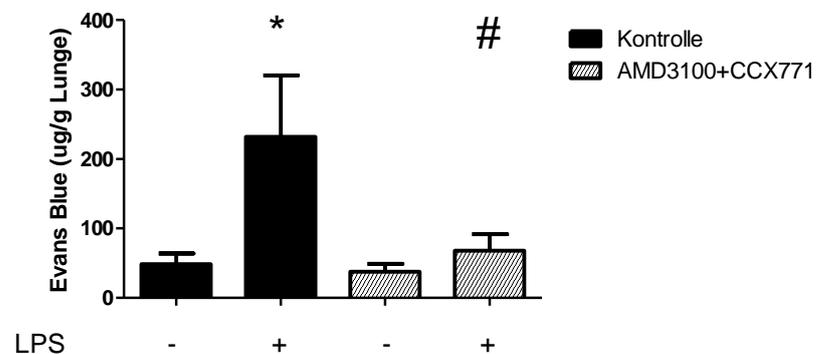


Abbildung 3.12: Einfluss der CXCR4- und CXCR7-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Evans Blue-Gehalt im Lungengewebe nach Applikation von AMD3100 und CCX771 im Vergleich zur Kontrollgruppe 6h nach der LPS-Inhalation. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n ≥ 6). *p < 0,05 gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. #p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. Modifiziert nach [179].

3.2.2 Mikrovaskuläre Permeabilität in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen

Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität durch Messung des Evans Blue Gehalts im Lungengewebe nach CXCR4-Inhibition mit AMD3100 in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen. Die LPS-Inhalation führt sowohl in den Lungen der Tier der Kontrollgruppe als auch in den Lungen der AMD3100-behandelten Tiere, zu einem signifikanten Anstieg des Evans Blue Gehalts im Lungengewebe gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. Ohne inflammatorischen Stimulus führt die Gabe von AMD3100 zu keiner Veränderung des Evans Blue Gehalts im Lungengewebe gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. Die Lungen der mit AMD3100-behandelten Tiere zeigen nach der LPS-Inhalation keinen signifikant niedrigeren Evans Blue Gehalt gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS (Kontrolle -LPS: $82,3 \pm 21,8 \mu\text{g/g}$; Kontrolle +LPS: $246,0 \pm 89,1 \mu\text{g/g}$; AMD3100 -LPS: $67,8 \pm 40,6 \mu\text{g/g}$; AMD3100 +LPS: $206,1 \pm 46,4 \mu\text{g/g}$; $p < 0,05$).

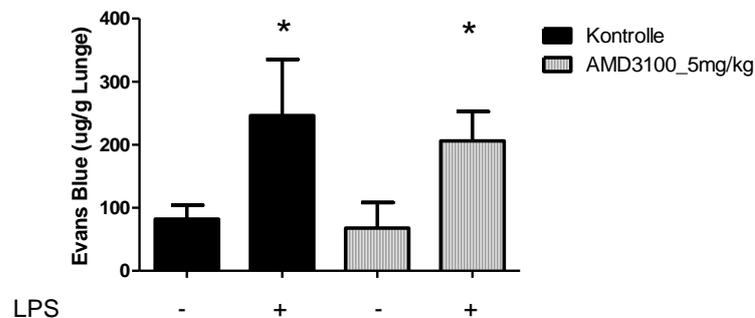


Abbildung 3.13: Einfluss der CXCR4-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen. Evans Blue-Gehalt im Lungengewebe nach Applikation von AMD3100 im Vergleich zur Kontrollgruppe 6h nach der LPS-Inhalation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 6$). * $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. Modifiziert nach [179].

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität nach CXCR7-Inhibition mit CCX771 in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen werden in der Abbildung 3.14 dargestellt. Auch hier führt die inflammatorische Stimulation der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg des Evans Blue Gehalts im Lungengewebe gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. Die Gabe des CCX771-Inhibitors ohne LPS führt zu keiner Veränderung des Evans Blue Gehalts verglichen mit Tieren der Kontrollgruppe ohne LPS. Die Lungen der mit CCX771-behandelten Tiere zeigen nach LPS-Inhalation einen höheren Evans Blue Gehalt als ohne LPS, weisen jedoch keinen signifikanten Unterschied im Evans Blue Gehalt gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS auf (Kontrolle -LPS: $81,7 \pm 29,0 \mu\text{g/g}$; Kontrolle +LPS: $205,8 \pm 63,9 \mu\text{g/g}$; CCX771 -LPS: $90,8 \pm 41,6 \mu\text{g/g}$; CCX771 +LPS: $229,4 \pm 64,4 \mu\text{g/g}$; $p < 0,05$).

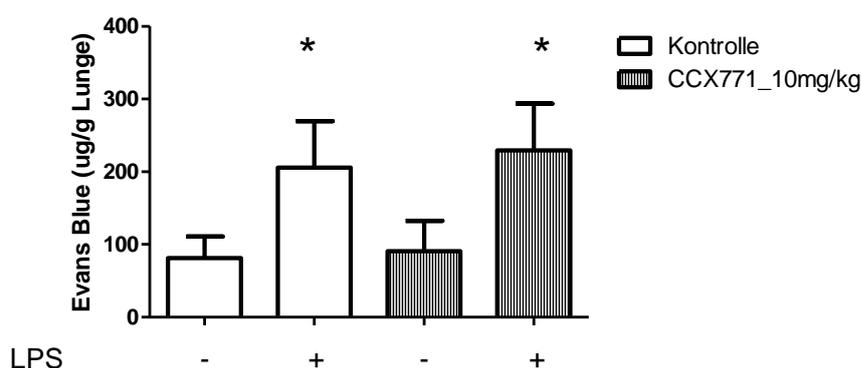


Abbildung 3.14: Einfluss der CXCR7-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen. Evans Blue-Gehalt im Lungengewebe nach Applikation von CCX771 im Vergleich zur Kontrollgruppe 6h nach der LPS-Inhalation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 6$). * $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Gruppe ohne LPS. Modifiziert nach [179].

3.3 Bestimmung der Zytokinkonzentration

3.3.1 Zytokinkonzentration nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6

Die Messung der Zytokine CXCL1 (KC), CXCL2/3 (MIP-2), TNF- α und IL-6 wurde in BAL-Proben durchgeführt, welche drei Stunden nach der LPS-Inhalation gewonnen wurden.

Abbildung 3.15 zeigt die Zytokinkonzentration nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Es ist zu sehen, dass in der Kontrollgruppe ohne inflammatorischen Stimulus keines der bestimmten Zytokine nachweisbar ist. Nach Inhalation von LPS kommt es in allen Gruppen zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokinkonzentration gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. In der Abbildung ist zu erkennen, dass sowohl die CXCR4- als auch die CXCR7-Inhibition die Konzentration aller vier gemessenen Zytokine im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS signifikant reduziert. Die CXCR4-Inhibition zeigt zur Inhibition des CXCR7 keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinkonzentration (CXCL1: Kontrolle -LPS: 0,0 \pm 0,0 pg/ml; Kontrolle +LPS: 2863 \pm 1202 pg/ml; AMD3100 +LPS: 1658 \pm 270,1 pg/ml; CCX771 +LPS: 1604 \pm 804,7 pg/ml. CXCL2/3: Kontrolle -LPS: 0,0 \pm 0,0 pg/ml; Kontrolle +LPS: 962 \pm 320 pg/ml; AMD3100 +LPS: 607,6 \pm 200,1 pg/ml; CCX771 +LPS: 581 \pm 358,8 pg/ml. TNF- α : Kontrolle -LPS: 0,0 \pm 0,0 pg/ml; Kontrolle +LPS: 1884 \pm 484,7 pg/ml; AMD3100 +LPS: 702,2 \pm 180,0 pg/ml; CCX771 +LPS: 936,1 \pm 458,5 pg/ml. IL-6: Kontrolle -LPS: 0,0 \pm 0,0 pg/ml; Kontrolle +LPS: 672 \pm 76,9 pg/ml; AMD3100 +LPS: 247,3 \pm 67,8 pg/ml; CCX771 +LPS: 212,8 \pm 100,4 pg/ml; p<0,05).

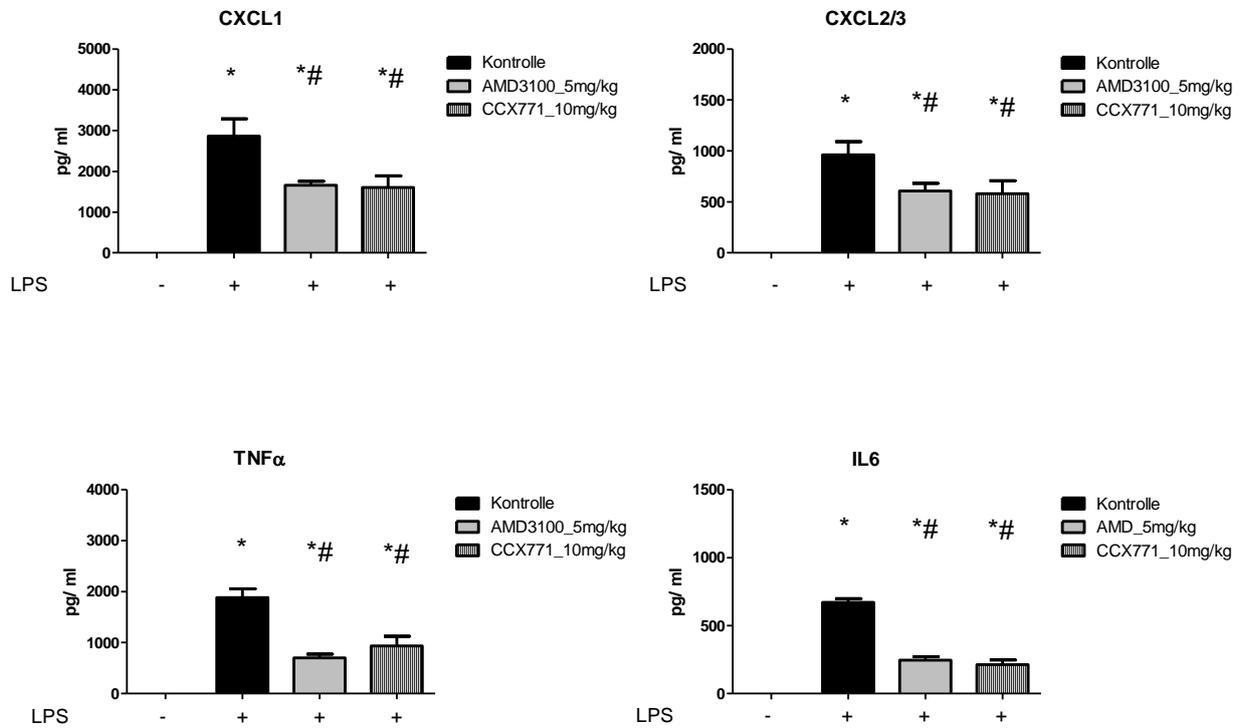


Abbildung 3.15: Zytokinkonzentration nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Konzentration der Zytokine CXCL1 (KC), CXCL2/3 (MIP-2), TNF-α und IL-6 in der BAL 3h nach LPS-Inhalation. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (ohne LPS: n=4; mit LPS: n≥6). *p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. #p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. Modifiziert nach [179].

3.3.2 Zytokinkonzentration nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in A_{2B}AR^{-/-} - Mäusen

In Abbildung 3.16 sind die Zytokinkonzentrationen nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in A_{2B}AR^{-/-} - Mäusen dargestellt. In der BAL der Kontrollgruppe ohne inflammatorischen Stimulus sind geringe Mengen an CXCL2/3 und TNF- α enthalten, wohingegen CXCL1 und IL-6 in dieser Gruppe nicht nachweisbar sind. In der Kontrollgruppe und den behandelten Versuchsgruppen kommt es nach der Inhalation von LPS zu einem signifikanten Anstieg aller gemessenen Zytokine gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. Die CXCR4-Inhibition zeigt nach der LPS-Inhalation in der BAL eine signifikant geringere CXCL1- und CXCL2/3- Konzentration als die mit CCX771-behandelten Gruppe mit LPS. Die TNF- α -Konzentration ist wiederum in der mit CCX771-behandelten Gruppe signifikant niedriger gegenüber der AMD3100-behandelten Versuchsgruppe. Nach Inhibition des CXCR4 durch AMD3100 und LPS-Inhalation ist die TNF- α -Konzentration signifikant höher als in der BAL der Kontrollgruppe mit LPS. Bezüglich des IL-6-Spiegels lassen sich zwischen den einzelnen Gruppen nach LPS-Inhalation keine Unterschiede ausmachen (CXCL1: Kontrolle -LPS: 0,0 \pm 0,0 pg/ml; Kontrolle +LPS: 1965 \pm 589,1 pg/ml; AMD3100 +LPS: 1591 \pm 366,3 pg/ml; CCX771 +LPS: 2474 \pm 599,8 pg/ml. CXCL2/3: Kontrolle -LPS: 20,5 \pm 14,3 pg/ml; Kontrolle +LPS: 1122 \pm 414,4 pg/ml; AMD3100 +LPS: 870,6 \pm 259,9 pg/ml; CCX771 +LPS: 1418 \pm 335,6 pg/ml. TNF- α : Kontrolle -LPS: 13,7 \pm 11,6 pg/ml; Kontrolle +LPS: 748,5 \pm 340 pg/ml; AMD3100 +LPS: 1167 \pm 274,4 pg/ml; CCX771 +LPS: 808,5 \pm 363,5 pg/ml. IL-6: Kontrolle -LPS: 0,0 \pm 0,0 pg/ml; Kontrolle +LPS: 447,9 \pm 236,2 pg/ml; AMD3100 +LPS: 399,8 \pm 225,3 pg/ml; CCX771 +LPS: 478,2 \pm 204,7 pg/ml; p<0,05).

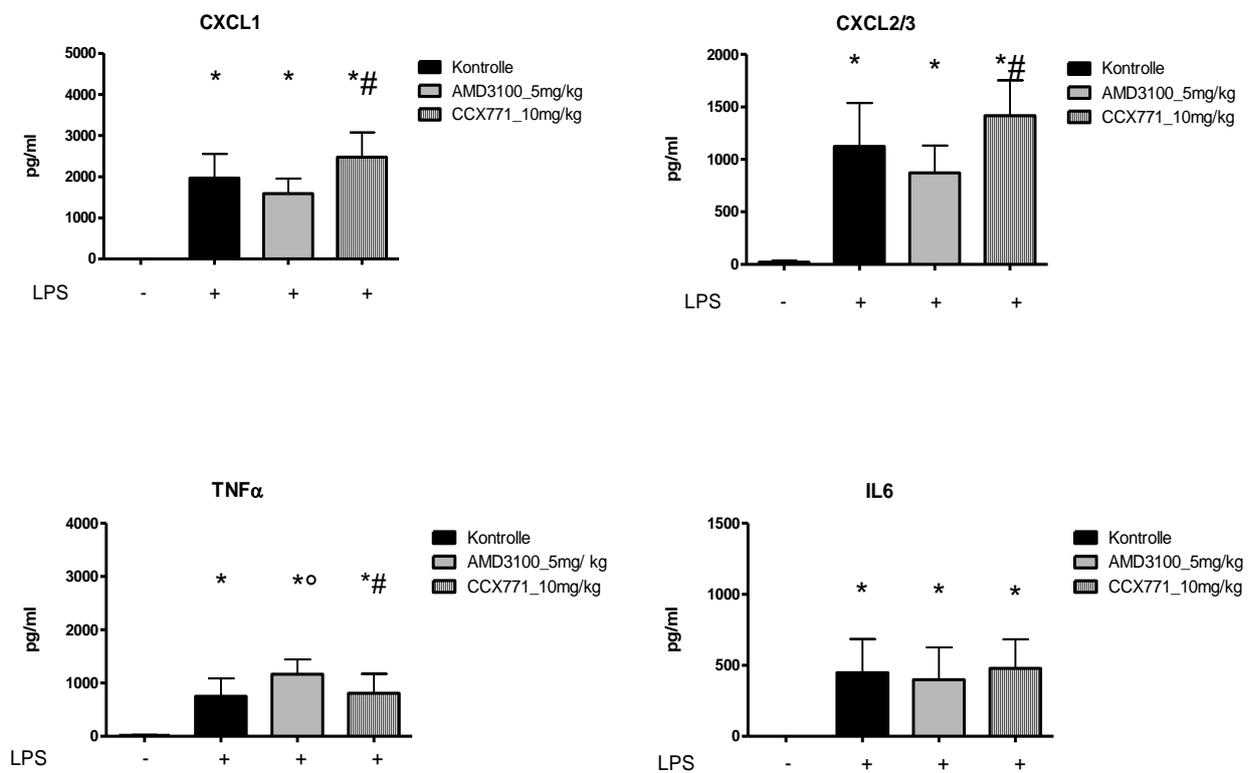


Abbildung 3.16: Zytokinkonzentration nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen. Konzentration der Zytokine CXCL1 (KC), CXCL2/3 (MIP-2), TNF- α und IL-6 in der BAL 3h nach LPS-Inhalation. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (ohne LPS: n=4; mit LPS: n \geq 6). *p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. #p < 0,05 gegenüber AMD3100 mit LPS. °p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. Modifiziert nach [179].

3.4 PMN-Infiltration der Lunge im histologischen Bild

Wie bereits unter 1.1.5 beschrieben, kommt es während der akuten pulmonalen Inflammation zur Schädigung der alveolokapillären Barriere. Diese ist gekennzeichnet durch eine Zunahme der Dicke der Alveolarsepten, ein interstitielles Ödem und die Einwanderung Neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe. Diese pathophysiologischen Vorgänge können mittels Histologie dargestellt werden.

3.4.1 PMN-Infiltration der Lunge nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6

Abbildung 3.17 zeigt die immunhistochemischen Bilder der Lungenpräparate nach der Inhibition des CXCR4 durch AMD3100 und des CXCR7 durch CCX771 im Vergleich zur Kontrollgruppe in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Nach der immunhistochemischen Färbung (siehe Kapitel 2.2.8) stellen sich die PMNs braun dar. Die Lungenpräparate der Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation zeigen schmale und zarte Alveolarsepten. Bei den AMD3100- und CCX771-behandelten Tieren ohne LPS-Inhalation sind zusätzlich noch vereinzelte PMNs zu erkennen. In der Kontrollgruppe führt die Inhalation von LPS zu einer Zunahme der PMN-Zahl in der Lunge und zu einer Verdickung der Alveolarsepten. Nach Inhibition des CXCR4 durch AMD3100 zeigen sich nach LPS-Inhalation weniger PMNs in der Lunge gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. Auch scheinen in der AMD3100-behandelten Gruppe mit LPS die Alveolarsepten schmaler zu sein. Nach Inhibition des CXCR7 durch CCX771 bzw. die kombinierte Inhibition beider Rezeptoren zeigen sich nach der Inhalation von LPS nur noch vereinzelte PMNs in der Lunge sowie ein nahezu normal erscheinender Lungenaufbau mit schmalen Alveolarsepten.

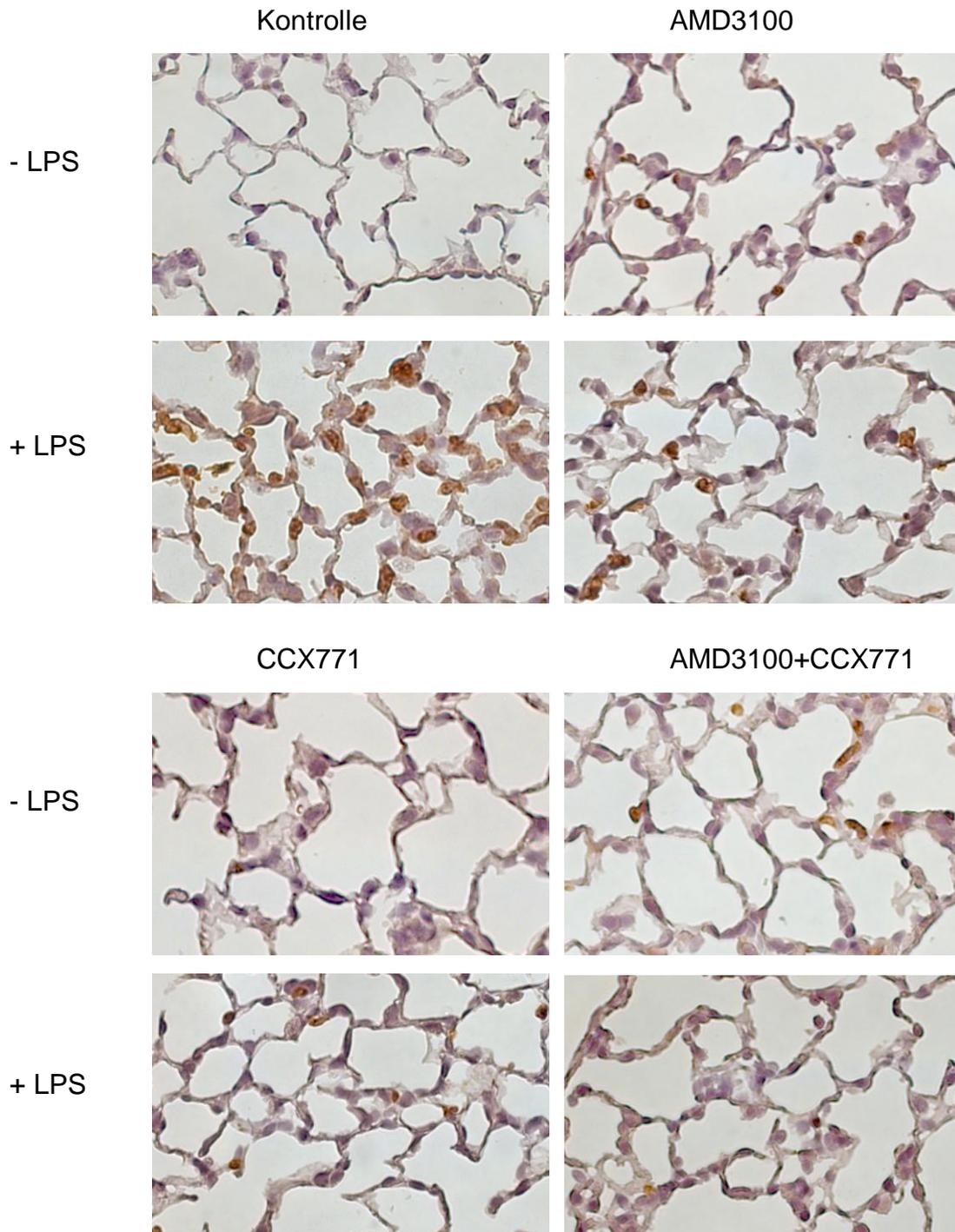


Abbildung 3.17: Immunhistochemische Darstellung der PMN-Infiltration nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6. Die Organentnahme für die immunhistochemische Färbung erfolgte 24h nach LPS-Inhalation. Die Färbung von PMNs (braun) erfolgte mit rat anti-mouse neutrophils 7/4. Die Bilder sind repräsentative Bilder in 63-facher Vergrößerung (n=4). Modifiziert nach [179].

3.4.2 PMN-Infiltration der Lunge nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen

Abbildung 3.18 zeigt die immunhistochemischen Bilder der Lungenpräparate nach der Inhibition des CXCR4 durch AMD3100 und CXCR7 durch CCX771 im Vergleich zur Kontrollgruppe in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen. Auch hier zeigen die Lungenpräparate der Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation schmale und zarte Alveolarsepten und vereinzelte PMNs. Die Lungenpräparate der AMD3100- und CCX771-behandelten Gruppen zeigen ohne inflammatorischen Stimulus ebenfalls schmale Alveolarsepten und lediglich vereinzelte PMNs in der Lunge. Die Inhalation von LPS führt in der Kontrollgruppe zu einer Verdickung der Alveolarsepten und zu einer Zunahme der PMN-Zahl in der Lunge. Die Histologiebilder der AMD3100- und CCX771- behandelten Gruppen weisen nach LPS-Inhalation weiterhin eine erhöhte Anzahl PMNs in der Lunge auf. Darüber hinaus scheinen die Alveolarsepten scheinen trotz Behandlung verdickt zu sein.

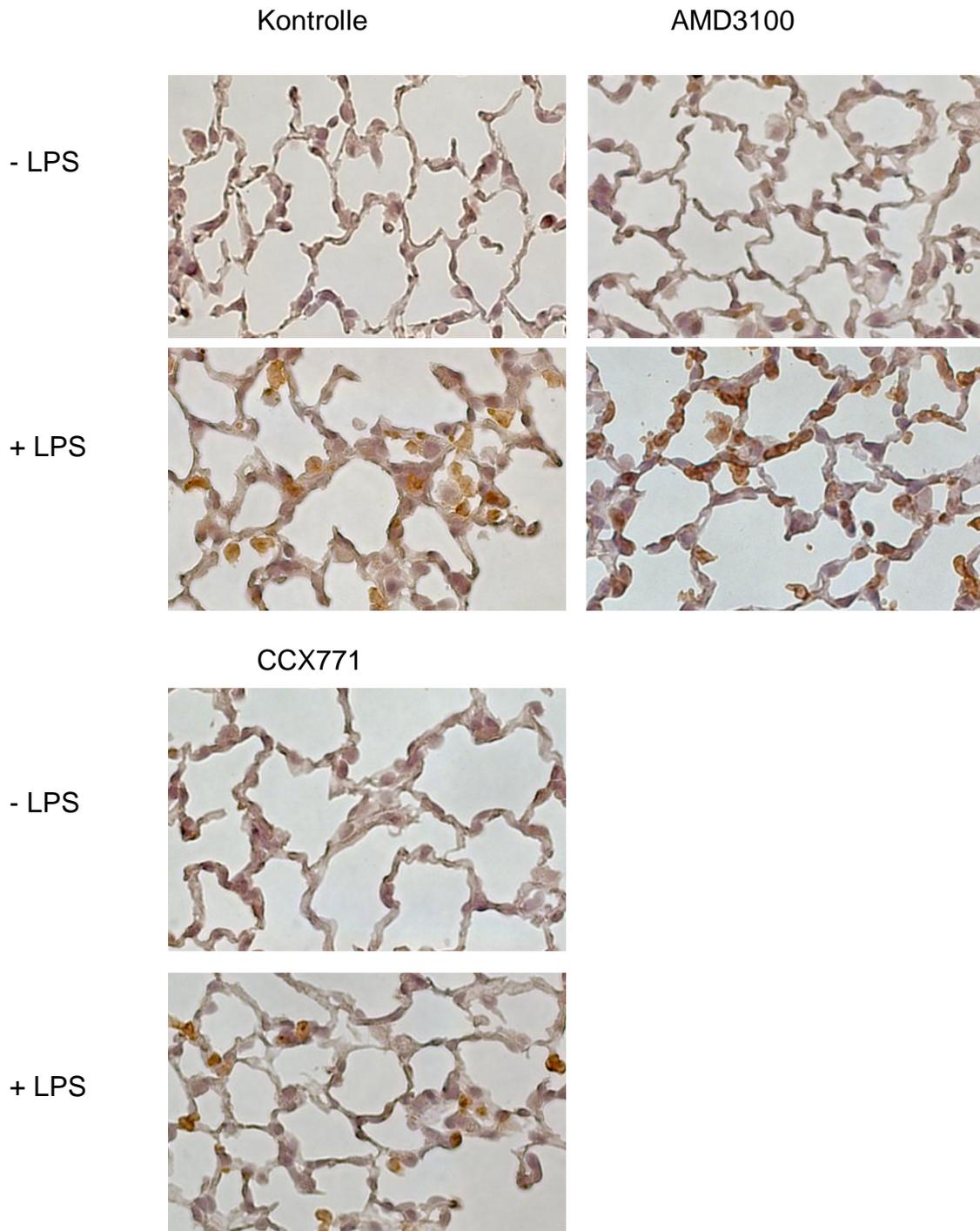


Abbildung 3.18: Immunhistochemische Darstellung der PMN-Infiltration nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in $A_{2B}AR^{-/-}$ - Mäusen. Die Organentnahme für die immunhistochemische Färbung erfolgte 24h nach LPS-Inhalation. Die Färbung von PMNs (braun) erfolgte mit rat anti-mouse neutrophils 7/4. Die Bilder sind repräsentative Bilder in 63-facher Vergrößerung (n=4). Modifiziert nach [179].

4. Diskussion

In der akuten pulmonalen Inflammation kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems. Wird ein Pathogen von Zellen des Immunsystems erkannt, wird eine Reihe an Vorgängen aktiviert. Es kommt zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, Chemotaxis und Migration Neutrophiler Granulozyten. Die Migration Neutrophiler Granulozyten über die endotheliale und epitheliale alveolokapilläre Barriere in die Lunge ist eine wichtige Komponente in der akuten pulmonalen Inflammation [55, 135]. Die Quantifizierung des Ausmaßes der PMN-Migration in die verschiedenen Lungenkompartimente nach inflammatorischer Stimulation war neben der Bestimmung des Capillary leak als weiteres pathogenetisches Merkmal der pulmonalen Inflammation Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Des weiteren untersuchten wir die alveoläre Sekretion von Zytokinen im akuten inflammatorischen Geschehen sowie den Einfluss einer Inhibition des CXCR4- bzw. CXCR7-Rezeptors in Abhängigkeit vom A_{2B}-Rezeptorstatus auf PMN-Migration, alveoläre Zytokinkonzentration und Capillary leak.

Das Chemokin SDF-1 wird im ALI vermehrt exprimiert [135] und nimmt durch die Bindung mit seinen beiden Rezeptoren, CXCR4 und CXCR7, eine bedeutende Rolle in der akuten pulmonalen Inflammation ein. Petty et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass im ALI sowohl die Expression des pulmonalen SDF-1 erhöht ist als auch die Expression des CXCR4 auf Neutrophilen Granulozyten gesteigert wird. Sie zeigten auch, dass die Inhibition des SDF-1-Chemokins die Migration der PMNs in die Lunge reduziert. Die Studie wurde sowohl an humanen als auch an murinen Lungenproben mit einer akuten Inflammation durchgeführt, wobei bei den Mäusen mittels LPS-Inhalation ein ALI induziert wurde [135]. Während einer Inflammation kommt dem SDF-1 über die Bindung mit dem CXC Rezeptor 4 eine zentrale Bedeutung zu, indem es an der schnellen Freisetzung Neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark [139] und an der Zellmigration beteiligt ist [180]. Die Expression des CXC Rezeptor 7 ist v.a. in hypoxischem Gewebe erhöht [145-147, 180] und über die Bindung mit SDF-1 ist es an der

Regeneration und Reparatur der Endothelzellen und deren Proliferation beteiligt [147, 180].

Für die Inhibition des CXCR4 wurde in der vorliegenden Arbeit der spezifische CXCR4-Inhibitor AMD3100 verwendet, welcher erstmals in den 1990ern von Bridger et al. beschrieben wurde [181, 182]. AMD3100 findet im klinischen Alltag Anwendung im Rahmen der Stammzell-Transplantation beim Non-Hodgkin Lymphom und Multiplem Myelom [182-184]. Darüber hinaus kommt der CXCR4-Inhibitor in der HIV-Therapie zum Einsatz, indem er das Eindringen des HI-Virus in die CD4⁺ - T-Zellen verhindert [173, 182, 185]. Ebenfalls spielt AMD3100 eine wichtige Rolle in der Behandlung von Erkrankungen, bei denen eine SDF-1/CXCR4-abhängige Pathogenese besteht, wie z.B. die Rheumatoide Arthritis, Atherosklerose und Asthma [186]. Bei der Ermittlung der wirksamsten AMD3100-Dosierung ergaben sich in unserem Versuchsaufbau zwischen der mit 5 mg/kg KG- und der mit 10 mg/kg KG-behandelten Gruppe keine signifikanten Unterschiede. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit für alle weiteren Versuche die niedrigere Dosierung gewählt. Zum einen wird im klinischen Alltag eine Therapie i.d.R. zunächst mit der niedrigst wirksamen Dosierung begonnen, zum anderen muss natürlich die Möglichkeit von Nebenwirkungen und Unverträglichkeiten bedacht und die Dosierung daher möglichst niedrig gehalten werden. Unverträglichkeiten auf AMD3100 treten selten auf und haben meist einen milden Verlauf [187]. Hendrix et al. konnten in ihren Studien zeigen, dass Unverträglichkeiten selten sind und dosisabhängig auftreten. So zeigten sich bei dem niedrigdosierten AMD3100 neben Kopfschmerzen und Mundtrockenheit auch Infektionen der oberen Atemwege, abdominale Blähungen und Krämpfe, Thrombozytopenie und vorzeitige Ventrikelkontraktionen. Bei einer höher dosierten AMD3100-Gabe konnten Parästhesien beobachtet werden. Eine Leukozytose zeigten alle Probanden, welche je nach Dosierung mehr oder weniger ausgeprägt war [173, 185]. Die AMD3100-induzierte Leukozytose kann durch die Mobilisierung der hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf erklärt werden [182, 187, 188].

Für die Inhibition des CXCR7 wurde in der vorliegenden Arbeit der CCX771-Inhibitor verwendet. Dieser findet im klinischen Alltag noch keine Anwendung.

Wie bereits erwähnt, ist die Migration Neutrophiler Granulozyten in die unterschiedlichen Lungenkompartimente ein wichtiges Merkmal der akuten pulmonalen Inflammation. Reutershan et al. konnten in ihrer Studie an murinen Modellen zeigen, dass die inhalative LPS-Exposition zu einer zunehmenden Migration der PMNs in alle Lungenkompartimente (Intravasal, Interstitium und Alveolarraum) führt. Die LPS-Inhalation induziert die intravasale PMN-Akkumulation, welche einen Spitzenwert nach vier Stunden erreicht. Während die transendotheliale Migration in das Interstitium bereits eine Stunde nach der LPS-Inhalation beginnt, kontinuierlich steigt und ihren Höchstwert zwischen zwölf und vierundzwanzig Stunden nach der LPS-Exposition erreicht, beginnt die transepitheliale Migration in den Alveolarraum erst nach zwei Stunden. In der BAL ist ein PMN-Peak nach 24 Stunden zu verzeichnen [55]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zellzahlbestimmung im Alveolarraum und im Lungeninterstitium, analog zu der Studie von Reutershan et al., 24 Stunden nach LPS-Inhalation durchgeführt. Bei den Wildtyp Mäusen zeigte sich Intravasal in der AMD3100-behandelten Gruppe ohne LPS-Exposition eine signifikant höhere PMN-Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation. Dieses Ergebnis kann durch die CXCR4-Inhibition mit AMD3100 erklärt werden. Die SDF-1/CXCR4 - Bindung ist an der Mobilisierung, Retention und am Homing der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark beteiligt [183]. Durch die Inhibition des CXCR4 kommt es zu einer ausgeprägten hämatopoetischen Zellfreisetzung aus dem Knochenmark [173, 182, 185, 187, 188]. Ergänzend dazu konnten Konrad et al. in ihrer Untersuchung zeigen, dass bei Wildtyp Mäusen im Blutbild die Gesamtzellzahl nach einer CXCR4-Inhibition mit AMD3100 ohne Stimulation durch LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant anstieg [179].

Die Behandlung der Wildtyp Mäuse, mit dem CXCR4-Inhibitor AMD3100 und dem CXCR7-Inhibitor CCX771 bewirkte in der vorliegenden Arbeit sowohl bei alleiniger Applikation als auch in Kombinationstherapie nach LPS-Exposition

eine verminderte PMN-Migration in das Interstitium und in den Alveolarraum gegenüber der Kontrollgruppe nach LPS-Inhalation. Lediglich die Mono-Applikation von CCX771 nach LPS-Inhalation hatte gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS keinen signifikanten Effekt auf die PMN-Migration in das Interstitium. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des CXCR4 einen stärkeren Effekt auf die Hemmung der Migration Neutrophiler Granulozyten in das Interstitium und in den Alveolarraum hat als die Inhibition des CXCR7 und die kombinierte Inhibition.

Die Wirkung des SDF-1 über den CXCR7 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine Studie von Costello et al. unterstützt unsere Erkenntnisse bezüglich einer Reduktion der Migration durch die Inhibition des CXCR4 bzw. dass die Inhibition des CXCR7 keine Reduktion der Migration bewirkt. Costello et al. zeigten in ihrer Studie, dass das SDF-1 über die Bindung mit dem CXCR4 für die Zellmigration verantwortlich ist. Die CXCR4-Inhibition in deren Studie konnte an rodenten Lungen, die endotheliale Zellmigration signifikant vermindern, während die CXCR7-Inhibition keinen Einfluss auf die Zellmigration hatte [180]. Eine andere Studie, in der die Leukozytenmigration ins zentralnervöse Parenchym im Rahmen einer autoimmunen Enzephalitis erforscht wurde, konnte zeigen, dass die CXCR7-Inhibition die Leukozytenmigration signifikant reduziert. Dies wird ermöglicht, durch die verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 bedingt durch die CXCR7-Inhibition [189]. Sartina et al. zeigten in ihrer Studie an chronisch hypoxischen Mäuselungen, dass eine Hypoxie die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 signifikant erhöht [147]. ICAM-1 und VCAM-1 sind essentiell für die Adhäsion der PMNs während der Migration (siehe Kapitel 1.3). Die erhöhte ICAM-1- und VCAM-1-Expression konnte in der Studie von Sartina et al. durch die CXCR7-Inhibition reduziert werden [147].

Im Vergleich zum Migrationsverhalten Neutrophiler Granulozyten in den Wildtyp Mäusen, zeigte auch das Migrationsverhalten der PMNs in A_{2B}AR-Knock-out Mäusen (A_{2B}AR^{-/-}), dass die LPS-Inhalation zu einer Erhöhung der PMN-Einwanderung in das Interstitium und in den Alveolarraum führte.

Die CXCR4-Inhibition mit AMD3100 ohne LPS-Stimulation führte auch bei den $A_{2B}AR^{-/-}$ Mäusen zu einer Erhöhung der intravasalen PMN-Zellzahl im Migrationsversuch. Dies lässt sich wieder durch die CXCR4-Inhibition erklären. Bedingt durch die Inhibition des Rezeptors kommt es zur hämatopoetischen Zellfreisetzung aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf [173, 182, 185, 187, 188]. In $A_{2B}AR^{-/-}$ Mäusen konnten wir nach LPS-Inhalation weder durch eine CXCR4-Inhibition durch AMD3100 noch durch eine CXCR7-Inhibition mittels CCX771 eine Reduktion der PMN-Migration in Interstitium und Alveolarraum gegenüber der Kontrollgruppe beobachten. Bei Mäusen, welche defizient für den A_{2B} -Rezeptor sind, scheint der protektive Effekt einer CXCR4- bzw. CXCR7-Inhibition, wie er bei den Wildtyp Mäusen gezeigt werden konnte, nicht zu bestehen. Dies lässt vermuten, dass die Wirkung des SDF-1 über die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 und die nachfolgende Signalkaskade von der Adenosinwirkung über den $A_{2B}AR$ abhängt. Die Ergebnisse einer Studie von Zhou et al. unterstützt die Ergebnisse der Migration Neutrophiler Granulozyten in der vorliegenden Arbeit. Zhou et al. zeigten in ihrer Studie an Mäusen mit Bleomycin-induzierter Lungenschädigung, dass die Wirkung von Adenosin über den $A_{2B}AR$ eine anti-inflammatorische Rolle einnimmt. Die intratracheal mit Bleomycin behandelten $A_{2B}AR^{-/-}$ Mäuse zeigten eine deutlich signifikante Erhöhung der PMN-Migration in den Alveolarraum gegenüber den intratracheal mit Bleomycin behandelten Wildtyp Mäusen. D.h. die Destruktion der alveolokapillären Barriere war bei den $A_{2B}AR$ -gendefizienten Mäusen um ein vielfaches ausgeprägter als bei Wildtyp Mäusen [190]. Eine Untersuchung von Konrad et al. konnte ebenfalls zeigen, dass die LPS-Inhalation in $A_{2B}AR^{-/-}$ Mäusen zu einer im Vergleich zu Wildtyp Mäusen vermehrten PMN-Migration in das Lungeninterstitium führte [191]. Auch eine Studie von Ngamsri et al. zeigte, dass eine CXCR4- und CXCR7-Inhibition in $A_{2B}AR^{-/-}$ Mäusen mit einer Zymosan-induzierten akuten Peritonitis, im Vergleich zu Wildtyp Mäusen keinen protektiven Effekt auf die PMN-Migration in die Peritoneallavage hatte [192].

Das Nukleosid Adenosin ist im Körper an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt (siehe Kapitel 1.7). Reutershan et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass Adenosin einen protektiven Effekt auf die

PMN-Migration in die verschiedenen Lungenkompartimente besitzt. Sie zeigten, dass eine LPS-Inhalation bei CD39- und CD73-gendefizienten Mäusen zu einer gegenüber Wildtyp Mäusen signifikant erhöhten PMN-Migration in das Interstitium und in den Alveolarraum führte. Darüber hinaus konnten sie in ihrer Studie zeigen, dass Wildtyp Mäuse mit einem LPS-induzierten ALI erhöhte Transkriptionsmengen von CD39 und CD73 aufwiesen, welche für den Abbau von ATP zu Adenosin essentiell sind [155]. Die zwei Subtypen vom A₂-Adenosinrezeptor, A_{2A}AR und A_{2B}AR, unterscheiden sich in ihrer Affinität gegenüber Adenosin. Während der A_{2A}AR eine hohe Affinität zu Adenosin besitzt und bereits bei physiologischen Adenosinkonzentrationen aktiviert wird, besitzt der A_{2B}AR eine schwache Affinität zu Adenosin und benötigt pathophysiologische Bedingungen und erhöhte Adenosinkonzentrationen um aktiviert werden zu können [161, 162].

Eine Hypoxie, Ischämie und eine akute Inflammation erhöhen die Transkription [157] und die Expression des A_{2B}AR [157, 164, 193, 194]. Eine Ventilator-Induced Lung Injury (VILI) erhöht die pulmonale Adenosinkonzentration [168].

Die Wirkung des Adenosins über den A_{2B}AR wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Adenosin besitzt sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Eigenschaften. In einer Untersuchung von Zhou et al. wurde gezeigt, dass die Adenosinwirkung über den A_{2B}AR bei intratrachealer Applikation von Bleomycin eine anti-inflammatorische Rolle einnimmt. A_{2B}AR-Knock-out-Mäuse zeigten hier eine gesteigerte Destruktion der alveolokapillären Barriere und eine verstärkte pulmonale Entzündungsreaktion im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Wurde Bleomycin systemisch appliziert zeigten sich zwischen Wildtyp Mäusen und A_{2B}AR^{-/-} Mäusen keine wesentlichen Unterschiede. Die Tiere reagierten auf die systemische Bleomycinbehandlung mit einer moderaten akuten Lungenschädigung und einer zunehmenden Lungenfibrose. Somit nimmt der A_{2B}AR im chronischen Verlauf einer Lungenschädigung eine profibrotische Rolle ein [190]. Andere Studien konnten die anti-inflammatorische Wirkung des Adenosins belegen [157, 168, 169]. A_{2B}-gendefiziente Mäuse mit einer LPS-induzierten akuten Lungenschädigung zeigten in einer Arbeit von Schingnitz et

al. im Vergleich zu Wildtyp Tieren eine deutlich schwerere pulmonale Entzündungsreaktion und wiesen histologisch vermehrt pulmonale Gewebsschädigungen auf. Die Behandlung der Wildtyp Mäuse mit einem A_{2B}AR-Agonist zeigte eine signifikante Abschwächung der pulmonalen Inflammation und des Lungenödems [157]. Weitere Studien zeigen, dass unter ischämischen Bedingungen die Aktivierung des A_{2B}AR die Expression des CXCR4 erhöht [171, 172].

Das Migrationsverhalten Neutrophiler Granulozyten über die alveolokapilläre Barriere beinhaltet die transendotheliale und die transepitheliale Migration. Um die endotheliale Schädigung und die daraus resultierende Permeabilitätserhöhung in der akuten pulmonalen Inflammation darzustellen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Extravasation des Farbstoffes Evans Blue bestimmt. Die Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität und das damit verbundene Capillary leak ermöglicht den Übertritt von Blutbestandteilen in das Lungeninterstitium und begünstigt die Ausbildung eines Lungenödems. So führte die LPS-Inhalation in der vorliegenden Arbeit zu einer deutlich gesteigerten Extravasation von Evans Blue in das Lungeninterstitium. Dieses Ergebnis wird durch die Studie von Reutershan et al. bestätigt. Auch in ihrer in-vivo-Studie, führte die LPS-Inhalation zu einer signifikanten Erhöhung der Extravasation von Evans Blue in das Lungeninterstitium [55]. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Schädigung der endothelialen Barriere. In unserer Arbeit konnte die Extravasation von Evans Blue in Wildtyp Mäusen sowohl durch die Inhibition des CXCR4 mit AMD3100 als auch durch die Inhibition des CXCR7 mit CCX771 deutlich reduziert werden. Die Ergebnisse des Extravasationsversuches lassen vermuten, dass die Inhibition des CXCR7 scheinbar einen minimal stärker ausgeprägten protektiven Effekt auf die endotheliale Barriere hat als die Inhibition des CXCR4.

Auch Costello et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Inhibition des CXCR7 die endotheliale Proliferation und den pulmonalen Gefäßumbau hemmt und somit die endotheliale Barriere stabilisiert [145, 180]. Die Studien wurden an humanen und rodenten Lungen mit pulmonaler arterieller Hypertension

(PAH) durchgeführt. Eine Studie von Sartina et al., welche an murinen Modellen mit hypoxisch-induzierter pulmonaler Hypertension durchgeführt wurde, konnte ebenfalls zeigen, dass die CXCR7-Inhibition die pulmonal endotheliale Zellproliferation und den Gefäßumbau hemmt [147]. Die kombinierte Inhibition des CXCR4 und CXCR7 zeigte in unserem Versuchsaufbau eine deutlich verminderte Extravasation von Evans Blue in das Lungeninterstitium gegenüber der AMD3100-behandelten Gruppe. Dieses Ergebnis kann mit den Studien von Sierro et al. und Levoye et al. unterstützt werden. In beiden Studien wird angenommen, dass CXCR7 mit CXCR4 eine heterodimere Bindung eingeht und dass dadurch die Wirkung der SDF-1-Signalkaskade verstärkt wird [141, 142]. Sierro et al. konnten in ihrer Studie an murinen Modellen zeigen, dass die heterodimere Bindung zwischen CXCR4 und CXCR7 eine zentrale Rolle in der endothelialen Biologie und in der fetalen Herzklappenentwicklung einnimmt [141]. In der Studie von Levoye et al. ist die heterodimere Bindung zwischen CXCR4 und CXCR7 für die SDF-1-vermittelte Chemotaxis essentiell [142]. Somit könnte erklärt werden, dass die kombinierte Inhibition den stärksten protektiven Effekt auf die endotheliale Barriere hat. Dieser Regulationsmechanismus ist jedoch noch unzureichend geklärt und verstanden und könnte daher in Zukunft als Ansatzpunkt für weitere Forschungsprojekte dienen.

Ein weiteres Merkmal der pulmonalen Inflammation ist die Ausbildung eines interstitiellen Ödems, welches sich unter anderem in einer Zunahme der Alveolarseptendicke zeigt. Diese kann neben einer Ansammlung von PMNs, im histologischen Bild veranschaulicht werden. Die immunhistochemischen Bilder der Lungen der Wildtyp Mäuse verdeutlichen die Destruktion der alveolokapillären Barriere nach LPS-Inhalation. Die LPS-Inhalation führte in der Kontrollgruppe zu deutlich verdickten Alveolarsepten als Zeichen eines interstitiellen Ödems und zu einer vermehrten PMN-Einwanderung in das Lungengewebe, wobei eine genaue Zuordnung der PMNs zu den einzelnen Lungenkompartimenten mit diesem Verfahren nicht möglich ist. Die Inhibition des CXCR4 mit AMD3100 oder des CXCR7 mit CCX771, ob als Monotherapie oder als Kombinationstherapie, konnte sowohl die interstitielle Ödembildung als

auch die PMN-Migration in das Lungengewebe hemmen. Konrad et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Inhibition des CXCR4 und CXCR7 die Alveolarseptendicke nach inflammatorischer Stimulation signifikant reduziert [179]. Die im Migrationsversuch deutlich gesteigerte PMN-Migration nach inflammatorischer Stimulation zeigt sich im histologischen Bild in einer qualitativen Zunahme der PMN-Ansammlung im Lungengewebe. Eine genaue Zuordnung zu den einzelnen Lungenkompartimenten ist hierbei jedoch nicht möglich. Die gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität, wie sie im Evans Blue-Extravasationsversuch deutlich wurde, spiegelt sich in der Histologie in der Zunahme der Alveolarseptendicke im Sinne eines interstitiellen Ödems wider. Die Wirkung beider Rezeptor-Inhibitionen auf die alveolokapilläre Barriere wird ebenfalls in der Literatur kontrovers diskutiert. Sartina et al. konnten in ihrer Studie anhand von Histologiebildern zeigen, dass in hypoxischen Mäuselungen die pulmonalen Gefäßwände der Arteriolen verdickt sind. Die Gefäßwandverdickung konnte durch die CXCR7-Inhibition reduziert werden, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die Inhibition des CXCR7 mit CCX771 den hypoxisch-bedingten pulmonalen Gefäßumbau hemmt und somit die alveolokapilläre Barriere stabilisiert [147]. Gambaryan et al. zeigten, dass eine Hypoxie die pulmonalen Gefäßwände der Arteriolen signifikant verdickt und den pulmonalen Gefäßumbau induziert. Die CXCR4-Inhibition mit AMD3100 konnte die Gefäßwandverdickung gegenüber der hypoxischen Kontrollgruppe signifikant reduzieren. Demgegenüber hatte die CXCR7-Inhibition mit CCX771 keinen protektiven Effekt auf die arterielle Gefäßwanddicke. Die kombinierte Inhibition beider Rezeptoren reduzierte wiederum signifikant die arterielle Gefäßwanddicke gegenüber der hypoxischen Kontrollgruppe und gegenüber der AMD3100-behandelten Gruppe. Somit zeigten sie mit ihrer Studie, dass die Inhibition mit AMD3100, ob als Mono- oder Kombinationsapplikation den pulmonalen Gefäßumbau reduziert [146]. An humanen und murinen Modellen mit abdominalen Aortenaneurysmen, konnten Michineau et al. zeigen, dass zum einen die SDF-1- und CXCR4-mRNA Konzentrationen erhöht sind, zum anderen konnten sie zeigen, dass die CXCR4-Inhibition mit AMD3100 die

Destruktion der Aortagefäßwand verhindert und somit die Makrophageninfiltration reduziert [195].

Im Vergleich zu den behandelten Wildtyp Mäusen zeigte in der vorliegenden Arbeit die LPS-Inhalation auch bei den A_{2B} -Knock-Out-Mäusen eine erhöhte Destruktion der endothelialen und epithelialen Barriere. Die LPS-Inhalation führte in den $A_{2B}AR^{-/-}$ Mäusen ebenfalls zu einer gesteigerten Extravasation des Farbstoffes Evans Blue in das Lungeninterstitium und auch die immunhistochemischen Bilder konnten zeigen, dass es zu verdickten Alveolarsepten und zu einer vermehrten Einwanderung der PMNs in das Lungengewebe kommt. Die CXCR4- und die CXCR7-Inhibition zeigte beim Fehlen des $A_{2B}AR$ keinen protektiven Effekt auf die alveolokapilläre Barriere. Es kam weder bei der CXCR4-Inhibition mit AMD3100 noch bei der Inhibition des CXCR7 mit CCX771 zu einer verminderten Extravasation des Evans Blue-Farbstoffes im Vergleich zur LPS-behandelten Kontrollgruppe. Auch in den immunhistochemischen Bildern konnte mit der AMD3100- und CCX771-Behandlung kein protektiver Effekt gezeigt werden. Durch die fehlende Wirkung des Adenosins über den $A_{2B}AR$ kam es auch nach der Inhibition des CXCR4 und CXCR7 zur Destruktion der alveolokapillären Barriere mit Zunahme der Alveolarseptendicke und vermehrten PMN-Einwanderung in das Lungengewebe. Die Studie von Konrad et al. konnte zeigen, dass die CXCR4- und CXCR7-Inhibition nach inflammatorischer Stimulation mit LPS die Alveolarseptendicke in den $A_{2B}AR^{-/-}$ Mäusen nicht signifikant reduziert [179]. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit werden durch die Studien von Eckle et al. unterstützt. Eckle et al. konnte mit seinen Studien an Wildtyp- und A_{2B} -Knock-out-Mäusen zeigen, dass eine Hypoxie oder VILI in $A_{2B}AR^{-/-}$ Mäusen zu einer signifikant erhöhten endothelialen Gefäßleckage führt. Wildtyp Tiere mit einer hypoxisch- bzw. VILI-induzierten Lungenschädigung zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe, nach der Behandlung mit einem selektiven $A_{2B}AR$ -Antagonisten eine signifikant höhere endotheliale Gefäß- und pulmonale Albuminleckage. Die mit dem $A_{2B}AR$ -Antagonist-behandelten Tiere zeigten zusätzlich eine schwerere pulmonale Inflammation mit einem ausgeprägteren Lungenödem und einem verminderten Gasaustausch. Demgegenüber zeigten Wildtyp Mäuse mit einer

hypoxisch- bzw- VILI-induzierten Lungenschädigung, welche zuvor mit einem A_{2B}AR-Agonisten behandelt wurden, eine komplette reversible endotheliale Gefäßleckage und die VILI-Symptome wurden signifikant abgemildert [168, 169]. Auch die Studie von Schingnitz et al. konnte zeigen, dass Mäuse mit einer LPS-induzierten Lungenschädigung und zusätzlich der fehlenden Adenosinwirkung über den A_{2B}AR einen histologisch schwereren pulmonalen Verlauf zeigen als Tiere der Kontrollgruppe. Wildtyp Mäuse mit einer LPS-induzierten Lungenschädigung, welche mit einem A_{2B}AR-Agonist behandelt wurden, zeigten eine abgeschwächte Form der pulmonalen Inflammation und einem signifikant weniger ausgeprägteren Lungenödem [157].

In der akuten pulmonalen Inflammation kommt es nach der Erkennung eines pathogenen Faktors nicht nur zur Migration Neutrophiler Granulozyten in die verschiedenen Lungenkompartimente und zur Destruktion der alveolokapillären Barriere, sondern es kommt auch zur Chemokin- und Zytokinproduktion und Sekretion. Schmal et al. konnten an Rattenlungen zeigen, dass eine LPS-Exposition sowohl zu einer Erhöhung der mRNA des Chemokins MIP-2 und zu einer Erhöhung des MIP-2 in der BAL führt [196]. Aktivierte Neutrophile Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen setzen in akuten inflammatorischen Ereignissen u.a. TNF- α und IL-6 frei, welche die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin und E-Selektin induzieren und erhöhen [197]. Wang et al. zeigten in ihrer in-vitro-Studie an Makrophagen, dass die Behandlung mit LPS zu einem Anstieg der TNF- α - und IL-6-Freisetzung führt. Ebenso führt die LPS-Behandlung zu einem Anstieg der NF- κ B-Konzentration und zusätzlich zu einer erhöhten Sekretion der sekundären Botenstoffe wie NO, cAMP und Calcium [198]. Somit spielen die Zytokine TNF- α und IL-6 eine wichtige Rolle in der Adhäsion Neutrophiler Granulozyten im Rahmen der Migration [197], während das CXCL1 (KC) und das CXCL2/3 (MIP-2) im Rahmen der Chemotaxis und Rekrutierung für Neutrophile Granulozyten eine zentrale Rolle spielen [196, 199]. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in Wildtyp Mäusen die LPS-Inhalation zu einer Konzentrationserhöhung der Chemokine CXCL1 (KC) und CXCL2/3 (MIP-2) und der Zytokine TNF- α und IL-6 in der BAL führt. Sowohl die CXCR4- als auch

die CXCR7-Inhibition führte zu einer signifikanten Reduktion der Sekretion aller vier bestimmten Zytokine bzw. Chemokine. Zwischen den beiden Inhibitoren war kein Unterschied zu verzeichnen. In der Studie von Michineau et al. konnte ebenfalls durch die CXCR4-Inhibition mit AMD3100 die Sekretion u.a. von MIP-1 β , MIP-2 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α reduziert werden. Dadurch konnte die Entstehung eines abdominalen Aortenaneurysmas verlangsamt werden [195]. Die Ergebnisse der Studie von Ngamsri et al. unterstützen die Ergebnisse der Zytokinbestimmung in der vorliegenden Arbeit. In deren Studie zeigten Wildtyp Mäuse mit einer Zymosan-induzierten akuten Peritonitis, nach der CXCR4- und CXCR7-Inhibition ebenfalls eine Reduktion der Zytokin- bzw. Chemokinsekretion in der Peritoneallavage [192].

In der vorliegenden Arbeit führte die LPS-Inhalation auch in den A_{2B}-Knock-out-Mäusen zu einer erhöhten Chemokin- und Zytokinfreisetzung. Die Inhibition des CXCR4 mit AMD3100 und des CXCR7 mit CCX771 zeigten nach inflammatorischer Stimulation mittels LPS bei A_{2B}AR^{-/-} Mäusen keine Reduktion der Chemokin- und Zytokinfreisetzung im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrollgruppe. Die CCX771-behandelten A_{2B}AR^{-/-} Mäuse zeigten eine signifikant höhere CXCL1- (KC) und CXCL2/3- (MIP-2) Sekretion gegenüber der Kontrollgruppe, wohingegen die TNF- α -Freisetzung in der CCX771-behandelten Gruppe signifikant niedriger war im Vergleich zur AMD3100-behandelten Versuchsgruppe. Die IL-6-Freisetzung zeigte nach der Inhibition beider Rezeptoren keinen signifikanten Unterschied.

Der Zusammenhang zwischen der SDF-1/CXCR4- und SDF-1/CXCR7-Signalkaskade und die gleichzeitige Adenosinwirkung über den A_{2B}AR und die daraus resultierende Auswirkung auf die Chemokin- und Zytokinfreisetzung wurde in der Literatur bisher selten beschrieben. Die Studie von Ngamsri et al. konnte zeigen, dass die CXCR4- und CXCR7-Inhibition in A_{2B}-Knock-out-Mäusen mit einer Zymosan-induzierten akuten Peritonitis die Chemokin- und Zytokinfreisetzung nicht signifikant reduziert gegenüber der Kontrollgruppe [192].

Deren Ergebnisse unterstützen somit die Chemokin-Zytokin-Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit. Weitere Studien zeigen die Rolle des Adenosins mit seiner Wirkung über den A_{2B}AR und der daraus resultierenden Beeinflussung der Chemokin- und Zytokinproduktion und -Sekretion. Dies wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnte die Studie von Schingnitz et al. zeigen, dass die Inhibition des Rezeptors A_{2B} in LPS-behandelten Wildtyp Mäusen zu signifikant höheren pulmonalen Transkriptionskonzentrationen von IL-1 β , TNF- α und IL-6 führte [157]. Eine weitere Studie konnte ebenfalls zeigen, dass in LPS-behandelten A_{2B}-Knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen signifikant höhere TNF- α - und IL-6-Konzentrationen zu verzeichnen sind [161]. In der Studie von Yang et al. konnte auch gezeigt werden, dass Makrophagen und Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells; VSMC) von A_{2B}AR^{-/-} Mäusen im Rahmen einer Gefäßerkrankung, signifikant höhere TNF- α -Konzentrationen aufweisen als Wildtyp Mäuse. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die IL-6-Konzentration sich in Wildtyp Mäusen und A_{2B}AR^{-/-} Mäusen nicht signifikant unterscheiden [170]. Demgegenüber konnte die Studie von Konrad et al. keinen protektiven Effekt der Adenosinwirkung über den A_{2B}AR auf die Chemokin- bzw. Zytokinfreisetzung zeigen. Wildtyp Mäuse und A_{2B}AR^{-/-} Mäuse zeigten nach der LPS-Inhalation keinen signifikanten Unterschied in der Chemokin- und Zytokinfreisetzung [191].

Werden alle Ergebnisse der Wildtyp Mäuse und der A_{2B}-Knock-out-Mäuse der vorliegenden Arbeit in der Zusammenschau betrachtet, lässt sich erkennen, dass die Wirkung des Adenosins über den A_{2B}AR mit der SDF1/CXCR4- und der SDF-1/CXCR7-Signalskaskade in Verbindung steht und in diesem Rahmen eine anti-inflammatorische Rolle einnimmt.

5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Dissertation verdeutlichen die Bedeutung der CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Abhängigkeit des A_{2B}AR-Status am murinen Modell einer LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation. Zum einen zeigen die Ergebnisse, dass sich eine CXCR4- Inhibition mit AMD3100 und eine CXCR7- Inhibition mit CCX771 in Anwesenheit des A_{2B}AR, positiv auf den Verlauf einer akuten pulmonalen Inflammation auswirkt. Die Inhibition des CXCR4 und CXCR7 zeigt in Wildtyp Mäusen protektive Effekte auf die endotheliale und epitheliale Barriere. Die Rezeptor-Inhibition bewirkt eine Reduktion der Migration Neutrophiler Granulozyten in die verschiedenen Lungenkompartimente und vermindert die Destruktion der alveolokapillären Barriere. Zusätzlich wird durch die Inhibition des CXCR4 und CXCR7 die Mikrovaskuläre Permeabilität signifikant vermindert und auch die Chemokin- und Zytokinfreisetzung wird reduziert. Zum anderen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die protektiven Effekte einer Inhibition des CXCR4 und des CXCR7 bei zeitgleichem Fehlen des A_{2B}AR ausbleiben.

Somit stellt die CXCR4-Inhibition mit AMD3100 und die CXCR7-Inhibition mit CCX771, mit einer vorausgehenden Bestimmung des A_{2B}AR-Status, eine mögliche Therapieoption im ARDS/ALI dar.

Der Zusammenhang zwischen der SDF-1/CXCR4-, SDF-1/CXCR7- Signalkaskade und der Wirkung des Adenosins über den A_{2B}AR ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch weitestgehend unerforscht und bietet daher neue Ansatzpunkte für die Erforschung von Therapiemöglichkeiten in der akuten pulmonalen Inflammation.

Desweiteren ist der Regulationsmechanismus der Interaktion des CXCR4 mit dem CXCR7 ebenfalls noch weitestgehend unerforscht und bietet ebenfalls neue Forschungsansätze für die Therapie in der akuten pulmonalen Inflammation.

6. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AECC	American-European Consensus Conference
AK	Antikörper
ALI	Acute Lung Injury
APC	Allophycocyanin
AR	Adenosinrezeptor
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
BSF-2	B-cell stimulating factor 2
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computer Tomographie
CXCL	C-X-C-Motiv Ligand
CXCR	C-X-C-Motiv Receptor, Chemokin-Rezeptor
DAB	Diaminobenzidine

DARC	Duffy Antigen Receptor for Chemokines
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
EPC	Endothelial Progenitor Cell
ESAM	Endothelzellen-selektive Adhäsionsmolekül
EZR	Extrazellularraum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
F _i O ₂	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward scatter
FSGO	Fish Skin Gelatin Oil
GAG	Glycosaminoglykane
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
JAM-A	Junctional Adhesion Molecule-A
KC	Keratinocyte-derived Chemokine
KG	Körpergewicht

K.o.	Knock-out
LBP	LPS-Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAC-1	Makrophagen Antigen-1
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein-2
NaCl	Natriumchlorid
NAP-1	Neutrophil-activating Protein 1
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NFW	Nukleotidfreies Wasser
NRS	Normal Rabbit Serum
PAF	Platelet Activating Factor, Plättchenaktivierender Faktor
P_{aw}	Pulmonalarterieller Verschlussdruck
P_aO_2	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphate-Buffered Saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PECAM	Platelet/ Endothelial-Cell Adhesion Molecule
PEEP	Positive End-Expiratory Pressure
PFA	Paraformaldehyd
PGE	Prostaglandin E
PGI	Prostaglandin
PMN	Polymorphonuclear Leukocyte, Neutrophile Granulozyten

PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1
RNA	Ribunukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, Reactive Oxygen Species
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subcutan
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
SSC	Side scatter
TLR	Toll Like Receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VILI	Ventilator Induced Lung Injury, Ventilator induzierte Lungenschädigung
VVO	Vesiko-Vakuoläre Organellen

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1 Darstellung einer Alveole
- Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der LPS-induzierten Inflammation
- Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der PMN-Migration
- Abbildung 1.4 Chemische Strukturformel von AMD3100
- Abbildung 2.1 Inhalationsdurchführung von LPS
- Abbildung 2.2 Blaufärbung der Akren nach der Evans Blue-i.v.-Injektion
- Abbildung 2.3 96-well-Platte nach Pipettierung
- Abbildung 2.4 Prinzip der Double-Antibody-Sandwich ELISA
- Abbildung 3.1 Migration Neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der AMD3100-Dosierung
- Abbildung 3.2 CXCR4-Inhibition zu unterschiedlichen Zeitpunkten
- Abbildung 3.3 CXCR7-Inhibition zu unterschiedlichen Zeitpunkten
- Abbildung 3.4 Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR4-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6
- Abbildung 3.5 Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6
- Abbildung 3.6 Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6
- Abbildung 3.7 Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR4-Inhibition in A_{2B}AR^{-/-} - Mäusen
- Abbildung 3.8 Migration Neutrophiler Granulozyten nach CXCR7-Inhibition in A_{2B}AR^{-/-} - Mäusen

- Abbildung 3.9 Makroskopischer Vergleich zweier Lungen nach intravenöser Evans Blue-Injektion
- Abbildung 3.10 Einfluss der CXCR4-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6
- Abbildung 3.11 Einfluss der CXCR7-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6
- Abbildung 3.12 Einfluss der CXCR4- und CXCR7-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6
- Abbildung 3.13 Einfluss der CXCR4-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität in A_{2B}AR^{-/-} - Mäusen
- Abbildung 3.14 Einfluss der CXCR7-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität in A_{2B}AR^{-/-} - Mäusen
- Abbildung 3.15 Zytokinkonzentration nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6
- Abbildung 3.16 Zytokinkonzentration nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in A_{2B}AR^{-/-} - Mäusen
- Abbildung 3.17 Immunhistochemische Darstellung der PMN-Infiltration nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in Wildtyp Mäusen C₅₇Bl/6
- Abbildung 3.18 Immunhistochemische Darstellung der PMN-Infiltration nach CXCR4- und CXCR7-Inhibition in A_{2B}AR^{-/-} - Mäusen

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Risikofaktoren, welche die Entstehung eines akuten Lungenversagens begünstigen

Tabelle 1.2 Physiologische Funktionen der Adenosinrezeptoren

Tabelle 2.1 Verdünnungsschema der Fluoreszenz-Antikörper

9. Literaturverzeichnis

1. Bernard, G.R., et al., *Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee.* Intensive Care Med, 1994. **20**(3): p. 225-32.
2. Ashbaugh, D.G., et al., *Acute respiratory distress in adults.* Lancet, 1967. **2**(7511): p. 319-23.
3. Force, A.D.T., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition.* JAMA, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
4. Bersten, A.D., et al., *Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States.* Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(4): p. 443-8.
5. Rubenfeld, G.D., et al., *Incidence and outcomes of acute lung injury.* N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1685-93.
6. Ferguson, N.D., et al., *The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material.* Intensive Care Med, 2012. **38**(10): p. 1573-82.
7. MacCallum, N.S. and T.W. Evans, *Epidemiology of acute lung injury.* Curr Opin Crit Care, 2005. **11**(1): p. 43-9.
8. Arroliga, A.C., et al., *Incidence of ARDS in an adult population of northeast Ohio.* Chest, 2002. **121**(6): p. 1972-6.
9. Linko, R., et al., *Acute respiratory failure in intensive care units. FINNALL: a prospective cohort study.* Intensive Care Med, 2009. **35**(8): p. 1352-61.
10. Luhr, O.R., et al., *Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group.* Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(6): p. 1849-61.
11. Wind, J., et al., *Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in The Netherlands: a survey.* Respir Med, 2007. **101**(10): p. 2091-8.
12. Hughes, M., et al., *Acute respiratory distress syndrome: an audit of incidence and outcome in Scottish intensive care units.* Anaesthesia, 2003. **58**(9): p. 838-45.
13. Irish Critical Care Trials, G., *Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in Ireland: a prospective audit of epidemiology and management.* Crit Care, 2008. **12**(1): p. R30.
14. Estenssoro, E., et al., *Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome.* Crit Care Med, 2002. **30**(11): p. 2450-6.
15. Iribarren, C., et al., *Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of ARDS: a 15-year cohort study in a managed care setting.* Chest, 2000. **117**(1): p. 163-8.
16. Monchi, M., et al., *Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(4): p. 1076-81.
17. Ferring, M. and J.L. Vincent, *Is outcome from ARDS related to the severity of respiratory failure?* Eur Respir J, 1997. **10**(6): p. 1297-300.
18. Erickson, S.E., et al., *Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005.* Crit Care Med, 2009. **37**(5): p. 1574-9.
19. Shorr, A.F., K.C. Abbott, and L.Y. Agadoa, *Acute respiratory distress syndrome after kidney transplantation: epidemiology, risk factors, and outcomes.* Crit Care Med, 2003. **31**(5): p. 1325-30.
20. Moss, M., et al., *Diabetic patients have a decreased incidence of acute respiratory distress syndrome.* Crit Care Med, 2000. **28**(7): p. 2187-92.

21. Zambon, M. and J.L. Vincent, *Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time*. Chest, 2008. **133**(5): p. 1120-7.
22. Brun-Buisson, C., et al., *Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study*. Intensive Care Med, 2004. **30**(1): p. 51-61.
23. Rocco Jr, T.R., et al., *A 9-year, single-institution, retrospective review of death rate and prognostic factors in adult respiratory distress syndrome*. Ann Surg, 2001. **233**(3): p. 414-22.
24. Herridge, M.S., et al., *One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2003. **348**(8): p. 683-93.
25. Hopkins, R.O., et al., *Two-year cognitive, emotional, and quality-of-life outcomes in acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(4): p. 340-7.
26. Ware, L.B., *Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. Semin Respir Crit Care Med, 2006. **27**(4): p. 337-49.
27. Lewis, J.F. and A.H. Jobe, *Surfactant and the adult respiratory distress syndrome*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(1): p. 218-33.
28. Pratt, P.C., et al., *Pulmonary morphology in a multihospital collaborative extracorporeal membrane oxygenation project. I. Light microscopy*. Am J Pathol, 1979. **95**(1): p. 191-214.
29. Meduri, G.U., *The role of the host defence response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment*. Eur Respir J, 1996. **9**(12): p. 2650-70.
30. Dushianthan, A., et al., *Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury*. Postgrad Med J, 2011. **87**(1031): p. 612-22.
31. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
32. Bachofen, M. and E.R. Weibel, *Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia*. Am Rev Respir Dis, 1977. **116**(4): p. 589-615.
33. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(6): p. 1376-83.
34. Wang, Y., et al., *Alveolar epithelial fluid transport can be simultaneously upregulated by both KGF and beta-agonist therapy*. J Appl Physiol (1985), 1999. **87**(5): p. 1852-60.
35. Tomashefski, J.F., Jr., et al., *The pulmonary vascular lesions of the adult respiratory distress syndrome*. Am J Pathol, 1983. **112**(1): p. 112-26.
36. Gattinoni, L., et al., *Lung structure and function in different stages of severe adult respiratory distress syndrome*. JAMA, 1994. **271**(22): p. 1772-9.
37. Jardin, F., et al., *Improved prognosis of acute respiratory distress syndrome 15 years on*. Intensive Care Med, 1999. **25**(9): p. 936-41.
38. *Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1301-8.
39. Samary, C.S., et al., *Biological Impact of Transpulmonary Driving Pressure in Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome*. Anesthesiology, 2015. **123**(2): p. 423-33.
40. Needham, D.M., et al., *Lung protective mechanical ventilation and two year survival in patients with acute lung injury: prospective cohort study*. BMJ, 2012. **344**: p. e2124.
41. Cepkova, M. and M.A. Matthay, *Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. J Intensive Care Med, 2006. **21**(3): p. 119-43.

42. Papazian, L., et al., *Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2010. **363**(12): p. 1107-16.
43. Wheeler, A.P. and G.R. Bernard, *Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review*. Lancet, 2007. **369**(9572): p. 1553-64.
44. Guerin, C., J. Reignier, and J.C. Richard, *Prone positioning in the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2013. **369**(10): p. 980-1.
45. Park, S.Y., et al., *The efficacy and safety of prone positioning in adults patients with acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials*. J Thorac Dis, 2015. **7**(3): p. 356-67.
46. National Heart, L., et al., *Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury*. N Engl J Med, 2006. **354**(24): p. 2564-75.
47. Anzueto, A., et al., *Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome*. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. N Engl J Med, 1996. **334**(22): p. 1417-21.
48. Fulkerson, W.J., et al., *Pathogenesis and treatment of the adult respiratory distress syndrome*. Arch Intern Med, 1996. **156**(1): p. 29-38.
49. Bernard, G.R., et al., *High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 1987. **317**(25): p. 1565-70.
50. Luce, J.M., et al., *Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock*. Am Rev Respir Dis, 1988. **138**(1): p. 62-8.
51. Pfeiffer, R., *I.-Preliminary Communication on the Exciting causes of Influenza*. Br Med J, 1892. **1**(1620): p. 128.
52. Holst, O., et al., *Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996. **16**(2): p. 83-104.
53. Thorn, J., *The inflammatory response in humans after inhalation of bacterial endotoxin: a review*. Inflamm Res, 2001. **50**(5): p. 254-61.
54. Maris, N.A., et al., *Antiinflammatory effects of salmeterol after inhalation of lipopolysaccharide by healthy volunteers*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(7): p. 878-84.
55. Reutershan, J., et al., *Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(5): p. L807-15.
56. Palsson-McDermott, E.M. and L.A. O'Neill, *Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4*. Immunology, 2004. **113**(2): p. 153-62.
57. Frey, E.A., et al., *Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1665-71.
58. Goyert, S.M., et al., *The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors*. Science, 1988. **239**(4839): p. 497-500.
59. Muroi, M., T. Ohnishi, and K. Tanamoto, *Regions of the mouse CD14 molecule required for toll-like receptor 2- and 4-mediated activation of NF-kappa B*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 42372-9.
60. Chopra, M., J.S. Reuben, and A.C. Sharma, *Acute lung injury:apoptosis and signaling mechanisms*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(4): p. 361-71.
61. de Rochemonteix-Galve, B., et al., *Tumor necrosis factor and interleukin-1 activities in free lung cells after single and repeated inhalation of bacterial endotoxin*. Infect Immun, 1991. **59**(10): p. 3646-50.
62. Witherden, I.R., et al., *Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **30**(4): p. 500-9.

63. Thorley, A.J., et al., *Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 463-73.
64. Middleton, J., et al., *Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium*. Blood, 2002. **100**(12): p. 3853-60.
65. Lee, J.S., et al., *Duffy antigen facilitates movement of chemokine across the endothelium in vitro and promotes neutrophil transmigration in vitro and in vivo*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5244-51.
66. Chaudhuri, A., et al., *Detection of Duffy antigen in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs*. Blood, 1997. **89**(2): p. 701-12.
67. Kuschert, G.S., et al., *Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses*. Biochemistry, 1999. **38**(39): p. 12959-68.
68. Pauwels, R.A., et al., *The effect of endotoxin inhalation on airway responsiveness and cellular influx in rats*. Am Rev Respir Dis, 1990. **141**(3): p. 540-5.
69. Bainton, D.F., *Neutrophil granules*. Br J Haematol, 1975. **29**(1): p. 17-22.
70. Furze, R.C. and S.M. Rankin, *The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse*. FASEB J, 2008. **22**(9): p. 3111-9.
71. Smith, J.A., *Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(6): p. 672-86.
72. Doeing, D.C., J.L. Borowicz, and E.T. Crockett, *Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods*. BMC Clin Pathol, 2003. **3**(1): p. 3.
73. Grommes, J. and O. Soehnlein, *Contribution of neutrophils to acute lung injury*. Mol Med, 2011. **17**(3-4): p. 293-307.
74. Hogg, J.C. and C.M. Doerschuk, *Leukocyte traffic in the lung*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 97-114.
75. Downey, G.P., et al., *Retention of leukocytes in capillaries: role of cell size and deformability*. J Appl Physiol (1985), 1990. **69**(5): p. 1767-78.
76. Zemans, R.L., S.P. Colgan, and G.P. Downey, *Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(5): p. 519-35.
77. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
78. Witko-Sarsat, V., et al., *Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects*. Lab Invest, 2000. **80**(5): p. 617-53.
79. Doerschuk, C.M., *Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages*. Respir Res, 2000. **1**(3): p. 136-40.
80. Doyle, N.A., et al., *Neutrophil margination, sequestration, and emigration in the lungs of L-selectin-deficient mice*. J Clin Invest, 1997. **99**(3): p. 526-33.
81. Kang, B.H., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 expression on the alveolar epithelium and its modification by hyperoxia*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. **9**(4): p. 350-5.
82. Jagels, M.A., et al., *Mechanisms and regulation of polymorphonuclear leukocyte and eosinophil adherence to human airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **21**(3): p. 418-27.
83. Burns, A.R., F. Takei, and C.M. Doerschuk, *Quantitation of ICAM-1 expression in mouse lung during pneumonia*. J Immunol, 1994. **153**(7): p. 3189-98.
84. Pelkmans, L. and A. Helenius, *Endocytosis via caveolae*. Traffic, 2002. **3**(5): p. 311-20.

85. Wang, Q. and C.M. Doerschuk, *Neutrophil-induced changes in the biomechanical properties of endothelial cells: roles of ICAM-1 and reactive oxygen species*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6487-94.
86. Korchak, H.M. and G. Weissmann, *Changes in membrane potential of human granulocytes antecede the metabolic responses to surface stimulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(8): p. 3818-22.
87. Whiting, J.C., et al., *Correlation between membrane potential changes and superoxide production in human granulocytes stimulated by phorbol myristate acetate. Evidence for defective activation in chronic granulomatous disease*. J Biol Chem, 1980. **255**(5): p. 1874-8.
88. Lazzari, K.G., P.J. Proto, and E.R. Simons, *Simultaneous measurement of stimulus-induced changes in cytoplasmic Ca²⁺ and in membrane potential of human neutrophils*. J Biol Chem, 1986. **261**(21): p. 9710-3.
89. Korchak, H.M., L.E. Rutherford, and G. Weissmann, *Stimulus response coupling in the human neutrophil. I. Kinetic analysis of changes in calcium permeability*. J Biol Chem, 1984. **259**(7): p. 4070-5.
90. Korchak, H.M., et al., *Stimulus response coupling in the human neutrophil. Differential requirements for receptor occupancy in neutrophil responses to a chemoattractant*. J Biol Chem, 1984. **259**(12): p. 7439-45.
91. Lum, H. and K.A. Roebuck, *Oxidant stress and endothelial cell dysfunction*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(4): p. C719-41.
92. Dinarello, C.A., *Biology of interleukin 1*. FASEB J, 1988. **2**(2): p. 108-15.
93. Dinarello, C.A., *Interleukin-1*. Dig Dis Sci, 1988. **33**(3 Suppl): p. 25S-35S.
94. Chu, E., et al., *Role of interleukin 1 in antigen-specific T cell proliferation*. J Immunol, 1984. **132**(3): p. 1311-6.
95. Tredget, E.E., et al., *Role of interleukin 1 and tumor necrosis factor on energy metabolism in rabbits*. Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 1): p. E760-8.
96. Tracey, K.J., et al., *Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia*. Nature, 1987. **330**(6149): p. 662-4.
97. Tracey, K.J., et al., *Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog*. Surg Gynecol Obstet, 1987. **164**(5): p. 415-22.
98. Tracey, K.J., S.F. Lowry, and A. Cerami, *Cachectin: a hormone that triggers acute shock and chronic cachexia*. J Infect Dis, 1988. **157**(3): p. 413-20.
99. Perlmutter, D.H., et al., *Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression*. J Clin Invest, 1986. **78**(5): p. 1349-54.
100. Beutler, B.A., I.W. Milsark, and A. Cerami, *Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo*. J Immunol, 1985. **135**(6): p. 3972-7.
101. Dayer, J.M., B. Beutler, and A. Cerami, *Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts*. J Exp Med, 1985. **162**(6): p. 2163-8.
102. Tracey, K.J., et al., *Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin*. Science, 1986. **234**(4775): p. 470-4.
103. Tracey, K.J., et al., *Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation*. J Exp Med, 1988. **167**(3): p. 1211-27.
104. Kishimoto, T., *The biology of interleukin-6*. Blood, 1989. **74**(1): p. 1-10.
105. Poupart, P., et al., *B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF)*. EMBO J, 1987. **6**(5): p. 1219-24.
106. Yasukawa, K., et al., *Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene*. EMBO J, 1987. **6**(10): p. 2939-45.

107. Muraguchi, A., et al., *The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells.* J Exp Med, 1988. **167**(2): p. 332-44.
108. Schindler, R., et al., *Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF.* Blood, 1990. **75**(1): p. 40-7.
109. Hirano, T., et al., *Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin.* Nature, 1986. **324**(6092): p. 73-6.
110. Hirano, T., et al., *Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2).* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(16): p. 5490-4.
111. Heinrich, P.C., J.V. Castell, and T. Andus, *Interleukin-6 and the acute phase response.* Biochem J, 1990. **265**(3): p. 621-36.
112. Gauldie, J., et al., *Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(20): p. 7251-5.
113. Okada, M., et al., *IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells.* J Immunol, 1988. **141**(5): p. 1543-9.
114. Takai, Y., et al., *B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes.* J Immunol, 1988. **140**(2): p. 508-12.
115. Noma, T., et al., *Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines.* Immunol Lett, 1987. **15**(3): p. 249-53.
116. Garman, R.D., et al., *B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7629-33.
117. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity.* Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
118. Borish, L.C. and J.W. Steinke, 2. *Cytokines and chemokines.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2 Suppl): p. S460-75.
119. Kunkel, S.L., et al., *Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung.* Exp Lung Res, 1991. **17**(1): p. 17-23.
120. Strieter, R.M., et al., *Human alveolar macrophage gene expression of interleukin-8 by tumor necrosis factor-alpha, lipopolysaccharide, and interleukin-1 beta.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1990. **2**(4): p. 321-6.
121. Standiford, T.J., et al., *Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung.* J Clin Invest, 1990. **86**(6): p. 1945-53.
122. Baggiolini, M., A. Walz, and S.L. Kunkel, *Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils.* J Clin Invest, 1989. **84**(4): p. 1045-9.
123. Kurdowska, A., et al., *Anti-interleukin 8 autoantibody: interleukin 8 complexes in the acute respiratory distress syndrome. Relationship between the complexes and clinical disease activity.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(2): p. 463-8.
124. Miller, E.J., et al., *Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality.* Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(2): p. 427-32.
125. Biffl, W.L., et al., *Interleukin-8 increases endothelial permeability independent of neutrophils.* J Trauma, 1995. **39**(1): p. 98-102; discussion 102-3.
126. Fukumoto, T., et al., *IL-8 is an essential mediator of the increased delayed-phase vascular permeability in LPS-induced rabbit pleurisy.* J Leukoc Biol, 1998. **63**(5): p. 584-90.

127. Detmers, P.A., et al., *Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils*. J Exp Med, 1990. **171**(4): p. 1155-62.
128. Detmers, P.A. and S.D. Wright, *Adhesion-Promoting Receptors on Leukocytes*. Current Opinion in Immunology, 1988. **1**(1): p. 10-15.
129. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 675-705.
130. Czermak, B.J., H.P. Friedl, and P.A. Ward, *Role and Regulation of Chemokines in Rodent Models of Lung Inflammation*. ILAR J, 1999. **40**(4): p. 163-166.
131. Belperio, J.A., et al., *Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury*. J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1703-16.
132. Burns, J.M., et al., *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development*. J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2201-13.
133. Teicher, B.A. and S.P. Fricker, *CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer*. Clinical Cancer Research, 2010. **16**(11): p. 2927-2931.
134. Chen, W.C., et al., *Lung defects in neonatal and adult stromal-derived factor-1 conditional knockout mice*. Cell Tissue Res, 2010. **342**(1): p. 75-85.
135. Petty, J.M., et al., *Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8148-57.
136. Nagasawa, T., *Role of chemokine SDF-1/PBSF and its receptor CXCR4 in blood vessel development*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **947**: p. 112-5; discussion 115-6.
137. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9448-53.
138. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 111-20.
139. Suratt, B.T., et al., *Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis*. Blood, 2004. **104**(2): p. 565-71.
140. Nagasawa, T., K. Tachibana, and T. Kishimoto, *A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection*. Semin Immunol, 1998. **10**(3): p. 179-85.
141. Sierro, F., et al., *Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(37): p. 14759-64.
142. Levoe, A., et al., *CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling*. Blood, 2009. **113**(24): p. 6085-93.
143. Luker, K.E., et al., *Imaging ligand-dependent activation of CXCR7*. Neoplasia, 2009. **11**(10): p. 1022-35.
144. Miao, Z., et al., *CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15735-40.
145. Costello, C.M., et al., *Lung-selective gene responses to alveolar hypoxia: potential role for the bone morphogenetic antagonist gremlin in pulmonary hypertension*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(2): p. L272-84.
146. Gambaryan, N., et al., *Targeting of c-kit+ haematopoietic progenitor cells prevents hypoxic pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2011. **37**(6): p. 1392-9.
147. Sartina, E., et al., *Antagonism of CXCR7 attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Pediatr Res, 2012. **71**(6): p. 682-8.

148. Naumann, U., et al., *CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9175.
149. <[Elsev.] BASICS Molekulare Zellbiologie (2011).pdf>.
150. <[Elsev.] BASICS Experimentelle Doktorarbeit (2011).pdf>.
151. Fredholm, B.B., *Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair*. Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1315-23.
152. Martin, C., et al., *High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock*. Crit Care Med, 2000. **28**(9): p. 3198-202.
153. Linden, J., *Adenosine in tissue protection and tissue regeneration*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(5): p. 1385-7.
154. Cagnina, R.E., et al., *Adenosine A2B receptors are highly expressed on murine type II alveolar epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(3): p. L467-74.
155. Reutershan, J., et al., *Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs*. FASEB J, 2009. **23**(2): p. 473-82.
156. Reutershan, J., et al., *Therapeutic anti-inflammatory effects of myeloid cell adenosine receptor A2a stimulation in lipopolysaccharide-induced lung injury*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1254-63.
157. Schingnitz, U., et al., *Signaling through the A2B adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5271-9.
158. Zhong, H., et al., *A(2B) adenosine receptors increase cytokine release by bronchial smooth muscle cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **30**(1): p. 118-25.
159. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(4): p. 527-52.
160. Schepp, C.P. and J. Reutershan, *Bench-to-bedside review: adenosine receptors--promising targets in acute lung injury?* Crit Care, 2008. **12**(5): p. 226.
161. Yang, D., et al., *The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1913-23.
162. Fredholm, B.B., et al., *Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells*. Biochem Pharmacol, 2001. **61**(4): p. 443-8.
163. Feoktistov, I., et al., *Hypoxia modulates adenosine receptors in human endothelial and smooth muscle cells toward an A2B angiogenic phenotype*. Hypertension, 2004. **44**(5): p. 649-54.
164. Zhong, H., et al., *Synergy between A2B adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(1): p. 2-8.
165. Ryzhov, S., et al., *Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A2B-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7726-33.
166. Feoktistov, I. and I. Biaggioni, *Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 1979-86.
167. Sun, C.X., et al., *Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2173-2182.
168. Eckle, T., et al., *A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(10): p. 3301-15.
169. Eckle, T., et al., *A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak*. Blood, 2008. **111**(4): p. 2024-35.
170. Yang, D., et al., *The A2b adenosine receptor protects against vascular injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 792-6.

171. Richard, C.L., E.Y. Tan, and J. Blay, *Adenosine upregulates CXCR4 and enhances the proliferative and migratory responses of human carcinoma cells to CXCL12/SDF-1alpha*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(9): p. 2044-53.
172. Rolland-Turner, M., et al., *Adenosine stimulates the migration of human endothelial progenitor cells. Role of CXCR4 and microRNA-150*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e54135.
173. Hendrix, C.W., et al., *Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(6): p. 1667-73.
174. Devine, S.M., et al., *Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction*. *Blood*, 2008. **112**(4): p. 990-8.
175. Wong, R.S., et al., *Comparison of the potential multiple binding modes of bicyclam, monocyclam, and noncyclam small-molecule CXC chemokine receptor 4 inhibitors*. *Mol Pharmacol*, 2008. **74**(6): p. 1485-95.
176. Sack U. Tárnok A, R.H., <Technische-und-methodische-Grundlagen-der-Durchflusszytometrie.pdf>. 2007: p. pp27-70.
177. Lequin, R.M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. *Clin Chem*, 2005. **51**(12): p. 2415-8.
178. Voller, A., A. Bartlett, and D.E. Bidwell, *Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques*. *J Clin Pathol*, 1978. **31**(6): p. 507-20.
179. Konrad, F.M., et al., *Inhibition of SDF-1 receptors CXCR4 and CXCR7 attenuates acute pulmonary inflammation via the adenosine A2B-receptor on blood cells*. *Cell Death Dis*, 2017. **8**(5): p. e2832.
180. Costello, C.M., et al., *A role for the CXCL12 receptor, CXCR7, in the pathogenesis of human pulmonary vascular disease*. *Eur Respir J*, 2012. **39**(6): p. 1415-24.
181. Bridger, G.J., et al., *Synthesis and structure-activity relationships of phenylenebis(methylene)-linked bis-tetraazamacrocycles that inhibit HIV replication. Effects of macrocyclic ring size and substituents on the aromatic linker*. *J Med Chem*, 1995. **38**(2): p. 366-78.
182. Fricker, S.P., et al., *Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(5): p. 588-96.
183. Teicher, B.A. and S.P. Fricker, *CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(11): p. 2927-31.
184. DiPersio, J.F., et al., *Plerixafor*. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. **8**(2): p. 105-6.
185. Hendrix, C.W., et al., *Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2004. **37**(2): p. 1253-62.
186. Hatse, S., et al., *Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4*. *FEBS Lett*, 2002. **527**(1-3): p. 255-62.
187. Flomenberg, N., J. DiPersio, and G. Calandra, *Role of CXCR4 chemokine receptor blockade using AMD3100 for mobilization of autologous hematopoietic progenitor cells*. *Acta Haematol*, 2005. **114**(4): p. 198-205.
188. Devine, S.M., et al., *Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(6): p. 1095-102.
189. Cruz-Orengo, L., et al., *CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity*. *J Exp Med*, 2011. **208**(2): p. 327-39.

190. Zhou, Y., et al., *Distinct roles for the A2B adenosine receptor in acute and chronic stages of bleomycin-induced lung injury*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 1097-106.
191. Konrad, F.M., et al., *Adenosine receptor A2b on hematopoietic cells mediates LPS-induced migration of PMNs into the lung interstitium*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **303**(5): p. L425-38.
192. Ngamsri, K.C., et al., *Inhibition of CXCR4 and CXCR7 Is Protective in Acute Peritoneal Inflammation*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 407.
193. Eltzschig, H.K., et al., *Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 783-96.
194. Eltzschig, H.K., et al., *Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism*. Blood, 2004. **104**(13): p. 3986-92.
195. Michineau, S., et al., *Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 blockade by AMD3100 inhibits experimental abdominal aortic aneurysm expansion through anti-inflammatory effects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(8): p. 1747-55.
196. Schmal, H., et al., *Role for macrophage inflammatory protein-2 in lipopolysaccharide-induced lung injury in rats*. J Immunol, 1996. **156**(5): p. 1963-72.
197. Zhang, J., et al., *Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e14525.
198. Wang, Z., et al., *Immunomodulatory effect of APS and PSP is mediated by Ca²⁺-cAMP and TLR4/NF- κ B signaling pathway in macrophage*. Int J Biol Macromol, 2017. **94**(Pt A): p. 283-289.
199. Reutershan, J., et al., *Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 695-702.

10. Erklärung zum Eigenanteil

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. Jörg Reutershan und Frau PD Dr. med. Franziska Konrad.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Irene Vollmer von mir mit Unterstützung durch Frau PD Dr. med. Franziska Konrad durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Frau PD Dr. med. Franziska Konrad durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Nadine Sylvina Meichßner

Mannheim, den 15.03.2022

11. Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Konrad, F.M., et al., Inhibition of SDF-1 receptors CXCR4 and CXCR7 attenuates acute pulmonary inflammation via the adenosine A2B-receptor on blood cells. *Cell Death Dis*, 2017.

Alle Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit, die in der obengenannten Publikation bereits veröffentlicht wurden, sind entsprechend gekennzeichnet.

12. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. med. Reutershan und Frau PD Dr. med. Franziska Konrad für die Konzeption der Arbeit und für die stets freundliche Betreuung während der gesamten Zeit der Versuchsdurchführung bedanken.

Ich möchte mich auch bei Frau Irene Vollmer für ihre gute Einarbeitung in die Versuche und ihre immer geduldige und freundliche Art bedanken.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Großeltern, die mir das Freisemester für die Versuchsdurchführung ermöglicht haben. Bei meiner Mutter möchte ich mich für die immer wieder motivierenden Worte bedanken.