

Aus der Universitätsklinik für
Anästhesiologie und Intensivmedizin Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. P. Rosenberger

Die Bedeutung des Adenosinrezeptors A_{2B}
bei der Migration neutrophiler Granulozyten im
Acute Respiratory Distress Syndrome

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Esther Witte

aus

Hagen

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Reutershan
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Glatzle

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	6
1.1	Akutes Lungenversagen	6
1.1.1	Definition der Syndrome <i>Acute Lung Injury</i> und <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>	6
1.1.2	Krankheitsauslösende Faktoren	6
1.1.3	Epidemiologie und <i>Outcome</i>	8
1.1.4	Pathophysiologie und Histopathologie	9
1.1.5	Therapie	10
1.2	Lipopolysaccharid-induziertes ALI/ARDS	11
1.3	Neutrophile Granulozyten	12
1.4	Inflammation und Zytokine	16
1.5	Adenosin und akute inflammatorische Prozesse der Lunge	19
1.6	Fragestellungen der Arbeit	22
2	Materialien und Methoden	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Mäusestämme und Zellen	23
2.1.2	Geräte	23
2.1.3	Materialien	25
2.1.4	Chemikalien	27
2.1.5	Lösungen, Medien und Zusätze	27
2.1.6	Enzyme	29
2.1.7	Medikamente	29
2.1.8	Antikörper, Marker, Primer	29
2.2	Methoden	31
2.2.1	Real-time reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	31

Inhaltsverzeichnis

2.2.2	Differentialblutbild	35
2.2.3	Histologie	35
2.2.4	Inhalation von Lipopolysaccharid	38
2.2.5	Behandlung mit Agonist/Antagonist von A _{2B} AR	39
2.2.6	Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	39
2.2.7	Präparation der Lunge	40
2.2.8	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i> , FACS)	41
2.2.9	Evans blue	44
2.2.10	Bestimmung der Zytokine (ELISA)	45
2.2.11	Transplantation	46
2.2.12	Zellen	47
2.2.13	Transmigrationsassay	49
2.2.14	Statistik	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Real-time-RT-PCR	53
3.2	Differentialblutbild	54
3.3	Histologische und immunhistochemische Untersuchung	54
3.4	Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten in vivo	56
3.5	Evans blue: Einfluss von A _{2B} AR auf die Permeabilität der kapillär-alveolären Membranen	62
3.6	ELISA: Einfluss von A _{2B} AR auf Zytokinausschüttung	64
3.7	Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten und Permeabilität der alveolär-kapillären Membranen bei vorheriger Behandlung mit A _{2B} AR-Agonist und -Antagonist	66
3.8	Migration neutrophiler Granulozyten in vitro	69
4	Diskussion	72
4.1	Rolle von A _{2B} AR bei der Migration neutrophiler Granulozyten	72

Inhaltsverzeichnis

4.2	Auswirkungen von A _{2B} AR auf die pulmonale Barrierefunktion, Zytokine und Chemokine	78
4.3	Therapeutische Möglichkeiten	82
4.4	Zusammenfassung	84
5	Abkürzungsverzeichnis	86
6	Abbildungsverzeichnis	89
7	Tabellenverzeichnis	90
8	Literaturverzeichnis	91

1 Einleitung

1.1 Akutes Lungenversagen

1.1.1 Definition der Syndrome *Acute Lung Injury* und *Acute Respiratory Distress Syndrome*

Das akute Lungenversagen ist durch eine generalisierte pulmonale Inflammation charakterisiert. Dieses Entzündungsgeschehen geht mit der Ausbildung eines Lungenödems einher, das nicht kardial, sondern durch die vermehrte Permeabilität der alveolär-kapillären Membranen bedingt ist. Hieraus resultiert eine schwere Gasaustauschstörung mit Hypoxämie. Je nach Ausmaß der Hypoxämie wird zwischen *Acute Lung Injury* (ALI) und *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) unterschieden (Bernard et al. 1994:819). Das ARDS ist die schwerwiegendste Ausprägung des ALI und wurde erstmals 1967 von Ashbaugh et al. beschrieben (Ashbaugh et al. 1967:319-323).

Beide Erkrankungsformen wurden 1992 von der *American-European Consensus Conference* (AECC) als Syndrome definiert. Sie zeigen eine akut einsetzende Klinik mit Dyspnoe, fortschreitende arterielle Hypoxämie und bilaterale Infiltrate im Röntgen-Thorax ohne Hinweise auf eine kardiale Ursache (Bernard et al. 1994:819).

Die genauen AECC-Diagnosekriterien sind in Tabelle 1 dargelegt.

1.1.2 Krankheitsauslösende Faktoren

ARDS und ALI können durch pulmonale (direkte) oder extrapulmonale (indirekte) Faktoren ausgelöst werden. Durch diese wird das Lungenparenchym direkt oder indirekt (über eine generalisierte Immunantwort) geschädigt (Ware, Matthay 2000:1338). Am häufigsten entstehen ALI und ARDS auf dem Boden einer Pneumonie (46 %). Aber auch eine schwere Sepsis (33 %) und Aspiration (11 %) sind häufige Ursachen (Rubenfeld et al. 2005:1691). Weitere krankheitsauslösende Faktoren sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Durch die Schädigung steigt die Permeabilität der alveolären und kapillären Membranen und es

kommt zu einem Lungenödem. Oft tritt dieses Lungenödem als erstes klinisches Symptom auf (Downey, Granton 1997:43).

Tabelle 1: American-European Consensus Conference Diagnosekriterien für ALI und ARDS (Bernard et al. 1994:819). PaO₂ = Sauerstoffpartialdruck, FiO₂ = Sauerstoffkonzentration

	Beginn	Oxygenierung	Röntgen-Thorax	Pulmonaler Verschlussdruck
ARDS	Akut	PaO ₂ /FiO ₂ ≤200 mmHg	Bilaterale Infiltrate	≤ 18 mmHg oder klinisch kein Anhalt für Linksherzinsuffizienz
ALI	Akut	PaO ₂ /FiO ₂ ≤300 mmHg	Bilaterale Infiltrate	≤ 18 mmHg oder klinisch kein Anhalt für Linksherzinsuffizienz

Tabelle 2: Erkrankungen, die mit der Entwicklung von ALI/ARDS einhergehen (Ware, Matthay 2000:1338).

Direkte Verletzung/Erkrankung	Indirekte Verletzung/Erkrankung
Pneumonie	Sepsis
Aspiration	Schwere Traumata
Lungenkontusion	Große chirurgische Eingriffe
Fett-, Luftembolie	Bluttransfusionen
Beinahe-Ertrinken	Akute Pankreatitis
Inhalationstrauma	
Reperfusionstrauma	

1.1.3 Epidemiologie und *Outcome*

Eine genaue Aussage über die Inzidenz und Letalität von ARDS/ALI ist anhand der Studienlage schwierig. Studien vor der Einführung der AECC-Diagnosekriterien können nachfolgend nicht berücksichtigt werden, da diese uneinheitliche Diagnosekriterien aufweisen und eine Vergleichbarkeit zu Studien nach Einführung der Diagnosekriterien nicht gegeben ist. Eine Studie von Rubenfeld et al. (*King County Lung Injury Project – KCLIP*) zeigt eine Inzidenz von 78,9 Fällen pro 100 000 Menschen/Jahr und eine Letalität von 38,5 % beim ALI und eine Inzidenz von 58,7 Fällen pro 100 000 Menschen/Jahr sowie eine Letalität von 41,1 % beim ARDS (Rubenfeld et al. 2005:1692). Goss et al. geben eine Inzidenz von 22,4 Erkrankungsfällen pro 100 000 Menschen/Jahr an (Goss et al. 2003:1607-1611). Beide Studien beziehen sich auf die Vereinigten Staaten von Amerika. In Europa liegen die Inzidenzen für ALI und ARDS in einer Studie mit 6 522 Krankenhauseinweisungen bei 7,1 % und bei einer Letalität von fast 55 % (Brun-Buisson et al. 2004:58). Luhr et al. ermitteln 17,9 Fälle pro 100 000 Menschen/Jahr mit einer Letalität von 41,2 % (Luhr et al. 1999:1858). In Australien ergab eine Studie eine Inzidenz von 34 Fällen beim ALI und 28 Fällen beim ARDS pro 100 000 Menschen/Jahr und eine Letalität von 32 % beim ALI sowie 34 % beim ARDS (Bersten et al. 2002:444). Obwohl die Letalität im Vergleich zum letzten Jahrzehnt gesunken ist (MacCullum, Evans 2005:47), wird anhand der Datenlage deutlich, dass ALI und ARDS auch heute noch mit einer hohen Letalität vergesellschaftet sind und ihnen demnach eine große Bedeutung in der Krankenversorgung und Forschung zukommt. Ob genetische Faktoren oder Umwelteinflüsse eine Rolle bei der Inzidenz und Letalität spielen und Inzidenz und Letalität deswegen je nach Land und Kontinent in den unterschiedlichen Studien stark variieren, ist noch nicht hinreichend bekannt.

Ebenso variiert die Sterblichkeit stark in Abhängigkeit vom Alter der Patienten und deren Risikoprofil. Dies bedeutet, dass fortgeschrittenes Alter, Schock oder Leberversagen eine erhöhte Sterbewahrscheinlichkeit und somit eine schlechtere Prognose mit sich bringen. Im Gegensatz dazu haben junge Traumapatienten-

ten das beste *Outcome* (Ely et al. 2002:32; Monchi 1998:1079; Rubenfeld et al. 2005:1689; Wheeler, Bernard 2007:1554).

Bei den meisten Patienten entscheidet sich innerhalb der ersten sieben bis zehn Tage, ob sie von einer Therapie profitieren oder nicht. Auch bei gutem Ansprechen auf eine Therapie erholt sich der Großteil nur sehr langsam. Mehr als zehn Prozent der Patienten werden über mehr als einen Monat maschinell beatmet (Wheeler, Gordon 2007:1554).

Studien zum Langzeit-*Outcome* zeigen, dass sich die Lungenfunktion zwar weitestgehend erholt, bei einigen Patienten jedoch auch nach zwölf Monaten noch Einschränkungen nachweisbar sind (Herridge et al. 2003). Neben der eingeschränkten Lungenfunktion sind vor allem muskuläre Schwäche, Abgeschlagenheit sowie neurokognitive und neuropsychologische Einschränkungen Folgen von ALI bzw. ARDS. Diese sind für die verzögerte Wiedereingliederung in das Berufsleben und ins soziale Umfeld verantwortlich (Herridge et al. 2003; Adhikari et al. 2009; Hopkins et al. 2005).

1.1.4 Pathophysiologie und Histopathologie

Histopathologisch werden drei Phasen unterschieden: die akute oder exsudative Phase, die proliferative und die fibrotische Phase. Die Phasen gehen fließend ineinander über und variieren je nach Schweregrad der Erkrankung (Beasley 2010:720).

In der **akuten/exsudativen Phase** zeigt sich eine diffuse alveoläre Schädigung. Es kommt zum Untergang von Alveolarepithelzellen, Pneumozyten Typ I und deren Zell-Zell-Verbänden (Meduri 1996:2651). Durch eine beginnende Schädigung des Endothels und Epithels kommt es zu einem interstitiellen und später auch alveolären proteinreichen Ödem mit einer Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten. Ebenfalls charakteristisch für die exsudative Phase ist die Ausbildung hyaliner Membranen (Pratt et al. 1979:199).

Die exsudative Phase geht nach ungefähr einer Woche in die **proliferative Phase** über. In dieser Phase kommt es einerseits zu einer Zerstörung der Pneumozyten Typ II als Folge der Lungenschädigung, andererseits im Rahmen

von Reparaturvorgängen zu einer Proliferation der Pneumozyten Typ II und zu einer weiteren Differenzierung der Pneumozyten Typ II zu Pneumozyten Typ I. Je größer das Schädigungsausmaß, desto mehr überwiegt die Zellzerstörung (Kobzik, Sholl 2009:50). Pneumozyten Typ II produzieren Surfactant, der für den Erhalt der Oberflächenspannung in den Alveolen benötigt wird und somit ein Kollabieren der Alveolen verhindert. Aus der Zerstörung der Pneumozyten Typ II resultierend kommt es zu einer gestörten alveolären *Clearance* und Surfactantproduktion (Ware 2006:340, Meduri 1996:2651). Dies führt zu Atelektasen und zu einem erschwerten Gasaustausch. Das Ausmaß der gestörten alveolären *Clearance* geht mit einer erhöhten Letalität und einem schlechteren *Outcome* der Patienten einher (Ware, Matthay 2001:1382). Zudem beginnen Myofibroblasten durch Lücken in der alveolären Membran einzuwandern und es kommt zu ersten Kollageneinlagerungen (Meduri 1996:2651).

Nach circa drei Wochen kann die proliferative Phase bei schweren oder wiederholten Schädigungen des Epithels oder durch inadäquate Reparierversuche in die **fibrotische Phase** übergehen. Dabei entwickelt sich eine interstitielle Fibrose mit Umbau der Lungenarchitektur. Die Fibrose ist irreversibel und führt letztendlich zu einer verminderten Lungen-*Compliance* mit fortschreitender chronischer Funktionseinschränkung der Lunge (Meduri 1996:2651, Ware 2006:338 ff., Beasley 2010:720).

1.1.5 Therapie

Die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich im Wesentlichen auf die Behandlung der Ursache und supportive Maßnahmen wie eine angemessene Steuerung des Flüssigkeitshaushaltes und Zufuhr von nutritiven Lösungen (Raghavendran et al. 2008:1913). Nur lungenprotektive Beatmungsstrategien wie die Beatmung mit niedrigen Tidalvolumina (6–8 ml/kg Körpergewicht) zeigen einen Überlebensvorteil (Acute respiratory distress syndrome network 2000:1306). In Studien wurden die Behandlungen mit Surfactant, Stickoxiden, Glucokortikoiden und Lysofyllin untersucht. Dabei konnte keine der pharmakologischen Behandlungen die Letalität reduzieren (Cepkova, Matthay 2006:123 ff.).

1.2 Lipopolysaccharid-induziertes ALI/ARDS

Endotoxin ist ein Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Häufig werden Endotoxin und Lipopolysaccharid (LPS) als Synonyme verwendet, obwohl LPS die chemisch hergestellte, reine Form des Endotoxins ist. Die Inhalation von LPS/Endotoxin löst eine lokale und systemische Entzündungsreaktion aus (Thorn 2001:260).

Das Endotoxin selbst setzt sich aus einem Polysaccharid, das die Löslichkeit in Wasser ermöglicht, und einem Lipid zusammen. Der Polysaccharidteil besteht aus einem Oligosaccharid mit einer Struktur, die abhängig von der Bakterienart variiert, und einem wenig variablen Kernbereich, der das Polysaccharid mit dem Lipid verbindet. Dieser Kernbereich löst die immunmodulatorischen und toxischen Effekte des LPS aus (Thorn 2001:254). Die genaue chemische Struktur von LPS ist in Abbildung 1 dargestellt.

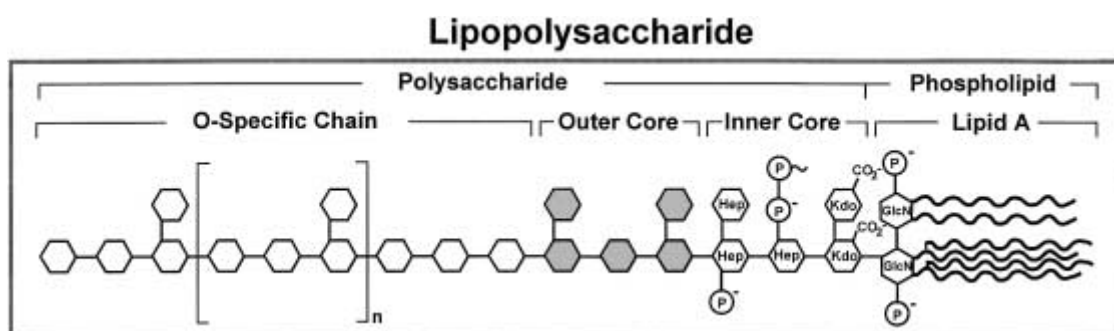


Abbildung 1: Chemische Struktur des Lipopolysaccharids (Holst et al. 1996:84).

An gesunden Freiwilligen konnte gezeigt werden, dass die Inhalation mit LPS zu vermehrter Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Lunge bzw. in den Alveolarraum führt (Maris et al. 2005:878 ff.). Auch in In-vivo-Modellen mit Mäusen konnte dies bestätigt werden (Reutershan et al. 2005, Basit et al. 2006:L202).

Das inhalede LPS bindet im Alveolarraum an das LPS-bindende Protein (LBP) und zusammen binden sie über *cluster of differentiation* (CD) 14 an die Oberflä-

che von Alveolarmakrophagen (Hailman et al. 1994:275). Dieser dreiteilige Komplex beeinflusst den *Toll-like-receptor-4/MD-2* (TLR-4/MD-2)-Rezeptorkomplex (Poltorak et al. 1998:2087). Die darauffolgenden Signalkaskaden führen zur Aktivierung von NF- κ B, das wiederum die Sekretion von Interleukin (IL) -1, -6, -8 und Tumornekrosefaktor- α (*tumor necrosis factor*, TNF- α) einleitet (Jeyaseelan et al. 2004:7254; Pålsson-McDermott, O'Neill 2004:153). Die ausgeschütteten Zytokine bzw. Chemokine werden an der abluminalen Seite der Endothelzelle von dieser aufgenommen und mittels Transzytose in Vesikeln zur luminalen Seite transportiert. Dort werden die Chemokine von den Endothelzellen präsentiert und aktivieren neutrophile Granulozyten. Man vermutet, dass Glykosaminoglykane (GAGs) bei der Bindung, beim Transport und bei der Präsentation der Chemokine eine Rolle spielen. Die aktivierten neutrophilen Granulozyten beginnen dann entlang des chemotaktischen Gradienten in die Lunge zu migrieren (vgl. Kapitel 1.3) (Middleton et al. 2002:3858).

1.3 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten, auch polymorphonukleäre Leukozyten (PMNs) genannt, haben wichtige Funktionen im unspezifischen Immunsystem des Menschen und dienen in erster Linie der Abwehr von Erregern. Sie gehören zur Zellreihe der Leukozyten, mit einem Anteil von ca. 50–60 %. Im Knochenmark werden täglich circa 10^{11} neutrophile Granulozyten gebildet (Cannistra, Griffin 1988) und reifen dort aus, bis sie in die Zirkulation gelangen. Dort verweilen sie zwischen vier und zehn Stunden, bevor sie sich an das Endothel anlagern und in Geweben anreichern (MacNee, Selby 1990). Nach ein bis zwei Tagen gehen die gealterten Zellen mittels Apoptose zugrunde und die Zellreste werden von Makrophagen entfernt (Savill et al. 1993:131). In Stresssituationen oder während Infektionen steigt die Differenzierungsrate bis auf das Zehnfache an (Cannistra, Griffin 1988). Sobald eine Immunantwort ausgelöst wird, finden sich neutrophile Granulozyten unter den ersten Zellen, die zum Ort der Infektion oder Zellschädigung wandern (Witko-Sarsat 2000:618). Die Immunabwehr erfolgt

mittels Phagozytose. Sobald die Phagozytose einsetzt, werden begleitend zwei antibiotische Prozesse aktiviert:

1. Es werden zytotoxische reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies freigesetzt, die zur Zerstörung der Zellstruktur des Pathogens führen.
2. Es kommt zur Degranulation azurophiler und spezifischer Granula, die verschiedene Enzyme wie Lysozyme, Collagenase, proteo- und saccharolytische Enzyme enthalten.

Normalerweise finden diese Reaktionen in den PMNs in sogenannten Phagolysosomen statt. Gelegentlich laufen diese antibiotischen Prozesse auch extrazellulär ab. Dann können überschießende Reaktionen – vor allem der degranulierenden Prozesse – das umliegende Gewebe zerstören und so zu einer chronischen Entzündungsreaktion führen (Smith 1994:675). Nach der Phagozytose begehen die neutrophilen Granulozyten ihrerseits den programmierten Zelltod, Apoptose, und werden von Makrophagen phagozytiert.

Bei akuten inflammatorischen Prozessen – wie bei ALI/ARDS – werden neutrophile Granulozyten rekrutiert. Dies erfolgt über mehrere Schritte, welche die Aktivierung der PMNs, das Rollen entlang des Endothels, die feste Adhäsion und letztendlich die transendotheliale und transepitheliale Migration umfassen. Diese Schritte sind in Abbildung 2 grafisch dargestellt.

Im ersten Schritt erfolgt die **Aktivierung** der PMNs. Nachdem die Lunge geschädigt wurde (vgl. Tabelle 2, Kapitel 1.1.2), schütten Alveolarmakrophagen und Pneumozyten Typ I verschiedene Zytokine wie IL-1, IL-8, TNF- α aus. Die PMNs werden durch die ausgeschütteten Zytokine aktiviert (vgl. Kapitel 1.2). Die Aktivierung führt über eine Veränderung des Cytoskeletts zu einer Verschlechterung der Verformbarkeit der PMNs. Diese akkumulieren dadurch verstärkt im Kapillarbett und in den postkapillären Venolen (vgl. Abbildung 2.1; Dorschuk et al. 1993; Downey et al. 1990; Witko-Sarsat 2000:618).

Im zweiten Schritt folgt nun eine lockere Anheftung der PMNs an die Gefäßwand. So können die PMNs an der Wand entlangrollen – daher auch **Rolling** genannt. Die Anheftung geschieht über Selektine; dabei befindet sich L-Selektin auf Neutrophilen, E- und P-Selektin auf den Endothelzellen (Witko-Sarsat 2000:

619). Selektine gehören zu den Adhäsionsmolekülen und sind Transmembranproteine. Eine vermehrte Expression der Selektine auf der luminalen Oberfläche der Endothelzellen wird durch die ausgeschütteten Zytokine ausgelöst (Lawrence, Springer 1993:6344). Selektine korrespondieren mit dem jeweils entsprechenden Liganden auf der Zielzelle. Es resultiert eine verlängerte Passagedauer, welche die Akkumulation der PMNs weiter unterstützt (vgl. Abb. 2.2).

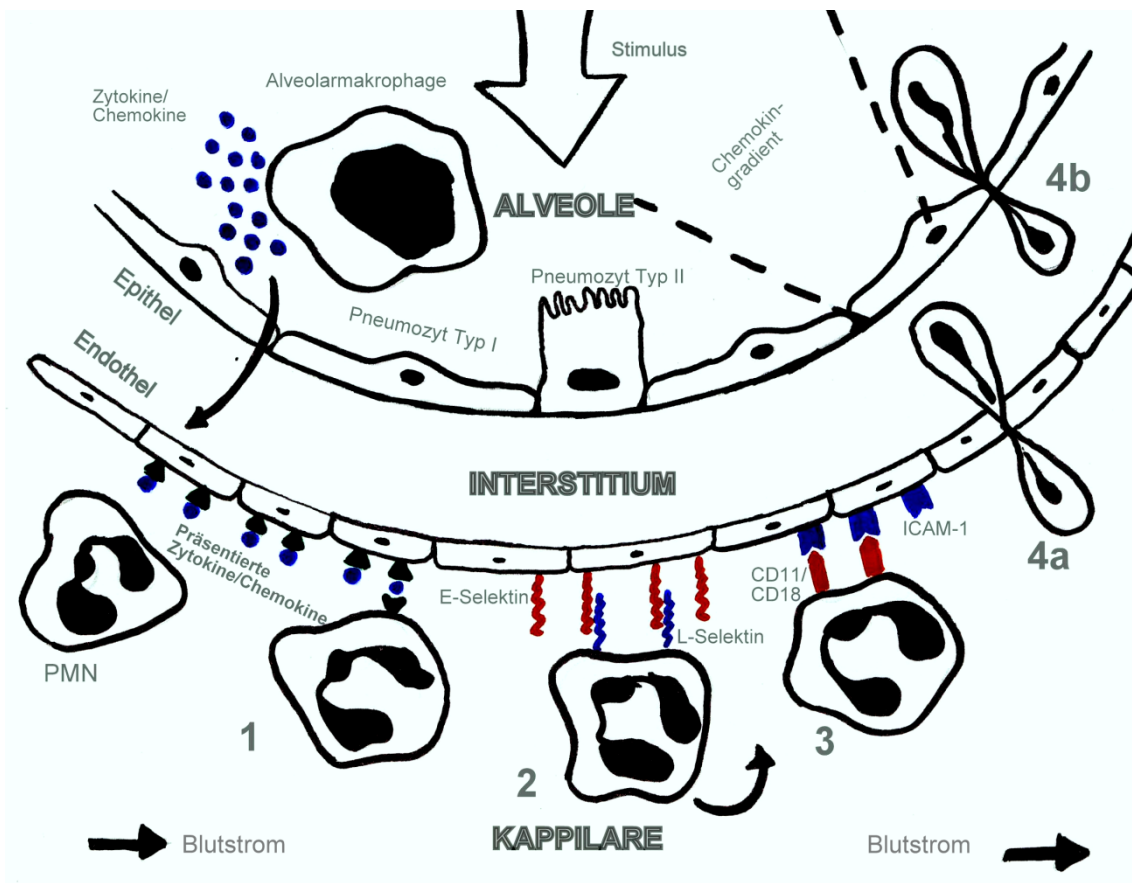


Abbildung 2: Migration neutrophiler Granulozyten. 1. Aktivierung der PMNs durch präsentierte Zytokine und Chemokine. 2. Lockere Anheftung und Rollen über E- und L-Selektin. 3. Feste Anheftung über CD11/CD18 und ICAM-1. 4a. Transendotheliale Migration. 4b. Transepitheliale Migration.

Im dritten Schritt binden die PMNs fest an das Endothel. Diese **Adhäsion** wird über β_2 -Integrine (CD11/CD18) auf den Neutrophilen und deren Ligand ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule*) auf den Endothelzellen reguliert (vgl. Abbil-

dung 2.3; Sligh et al. 1993:8532; Furie et al. 1991:2095). Diese Interaktion kann nur bei aktivierten PMNs stattfinden. Auf inaktiven PMNs sind die Integrine nicht in der Lage, mit ihrem Liganden zu binden. Es findet zudem eine verstärkte Expression des Liganden – getriggert durch IL-1 und TNF- α an der luminalen Endotheloberfläche – statt (Wittko-Sarsat et al. 2000:619).

Der vierte Schritt umfasst die **transendotheliale und transepitheliale Migration**. Die transendotheliale Migration erfolgt hauptsächlich an den Zellgrenzen der endothelialen Zellen. In der Umgebung von festen Bindungen (CD11/CD18 und ICAM-1) zwischen PMNs und Endothel kommt es zu einer Umorganisation der Bindungskomponenten VE-cadherin, β -catenin und Plakoglobin (Del Maschio et al. 1996:498). Die PMNs wandern dann dem Konzentrationsgefälle der chemotaktischen Stoffe entsprechend durch das Interstitium zum Ort der Schädigung (vgl. Abbildung 2.4a).

Bei vielen entzündlichen Erkrankungen migrieren die Neutrophilen letztlich über ein polarisiertes Epithel und sammeln sich in einem Lumen (Parkos 1997:865). Die transepitheliale Migration setzt eine Spaltung der interzellulären *tight junctions* voraus (Parkos 1997:866, Nash et al. 1987:1110). Komplexe Signalabläufe führen zu einer kortikalen Restrukturierung (Hofman et al. 1996:C319). Nach der Passage der neutrophilen Granulozyten folgt eine erneute Versiegelung der *tight junctions* (vgl. Abbildung 2.4b). Da nach einem pathogenen Stimulus vermehrt PMNs in die Lunge einwandern, kommt es durch deren Ausschüttung toxischer Stoffe und durch die mechanische Beanspruchung durch Pseudopoden der PMNs zu Schädigungen der epithelialen Barriere. Dies führt zu parazellulärer Permeabilität, Einstrom von Flüssigkeit und klinisch zu einem Lungenödem, welches für ALI und ARDS charakteristisch ist (Zemans et al. 2009:525). Abraham zeigt in mehreren Studien, dass neutrophile Granulozyten bei der Entstehung des ALI eine wichtige Rolle spielen. Die Schwere des ALI nimmt ab, wenn die PMNs eliminiert werden (Abraham et al. 2000:L1139). Durch die Ausschüttung von Zytokinen führen PMNs selbst zur Einwanderung weiterer PMNs, die durch die Migration das Lungengewebe weiter schädigen (Abraham 2003:S198).

1.4 Inflammation und Zytokine

Ein typisches Merkmal von Entzündungen ist die Rekrutierung von Leukozyten. Für diese Rekrutierung muss eine interzelluläre Kommunikation zwischen den infiltrierenden Leukozyten, dem Endothel sowie den Stroma- und Parenchymzellen stattfinden.

Dies geschieht über Zytokine der frühen oder akuten Phase wie TNF- α und IL-1, mittels der Expression von Adhäsionsmolekülen an den Zelloberflächen und durch die Produktion chemotaktischer Moleküle – Chemokine (Keane, Strieter 2000:N14). Das folgende Kapitel vermittelt einen kurzen Überblick über die beteiligten Zytokine und Chemokine.

Der **Tumornekrosefaktor (TNF)** hat zwei Unterformen, TNF- α (Cachectin) und TNF- β (Lymphotoxin). TNF- α wird in erster Linie von Makrophagen ausgeschüttet, wobei auch aktivierte Lymphozyten, *natural killer cells*, Endothelzellen sowie Mastzellen TNF- α produzieren können. Der potenteste Reiz ist LPS. TNF- β wird ausschließlich von Lymphozyten gebildet (Beutler, Cerami 1989:630 f.). Die Tumornekrosefaktoren erzeugen Immunität gegenüber Tumoren durch direkte zytotoxische Effekte an Krebszellen (Carswell et al. 1975:3669). Zudem führt TNF zur Ausschüttung von IL-1 aus ruhenden Makrophagen (Bachwich et al. 1986:96) und Endothelzellen (Libby et al. 1986:183). Es beeinflusst des Weiteren Endothelzellen, Adhäsionsmoleküle zu produzieren (Gamble et al. 1985:8670). Diese Adhäsionsmoleküle werden als intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1), vaskuläre Adhäsionsmoleküle (*vascular cell adhesion molecule*, VCAM-1) und E-Selektin (vgl. Kapitel 1.3) bezeichnet. Zudem spielt TNF eine große Rolle bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten (Gamble et al. 1985:8670), bei Chemotaxis (Ming et al. 1987), aber auch bei der Degranulation und beim *respiratory burst* (Klebanoff et al. 1986:4223). Unter *respiratory burst* wird die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus neutrophilen Granulozyten und Mastzellen bei der Phagozytose verstanden. Zudem ist TNF verantwortlich für die schwere Kachexie, wie man sie bei Tumorerkrankungen oder chronischen Infektionen beobachten kann (Beutler et al. 1985:994), und er ist

der erste Mediator eines toxischen Schocks oder der Sepsis (Tracey et al. 1987:664).

Ebenfalls ein Zytokin der frühen bzw. akuten Phase ist das **Interleukin-1**, welches innerhalb von Stunden nach einer Gewebsschädigung oder Infektion die verschiedensten Einflüsse auf fast alle Gewebe und Organe hat.

Ursprünglich wurde es endogenes Pyrogen genannt, weil es Fieber auslöste (Atkins 1960:628). In erster Linie wird IL-1 von Makrophagen produziert, aber auch Astrozyten, B- und T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, Keratozyten und noch einige mehr sind dazu befähigt (Dinarello 1988a:109). Bei gesunden Individuen wird kein IL-1 produziert – mit Ausnahme von Keratozyten der Haut, einigen Epithelzellen, Neuronen und Zellen der Nebenniere (Dinarello, Wolff 1993:107). IL-1 bewirkt sehr viele Reaktionen im Körper. Eine der wichtigsten ist die Aktivierung von T-Lymphozyten sowie eine Verstärkung der B-Zell-Proliferation und gesteigerte Immunglobulinsynthese. Es beeinflusst das zentrale Nervensystem und erzeugt Fieber, Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Gewichtsabnahme. In der Leber hemmt IL-1 die Proteinsynthese, z. B. von Albumin, und stimuliert die Herstellung sogenannter Akute-Phase-Proteinen wie des C-reaktiven Proteins (CRP). Am Endothel führt IL-1 durch die vermehrte Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektinen zu einer gesteigerten Adhäsion von Leukozyten (vgl. Kapitel 1.3). Das Endothel schüttet vermehrt PGI₂ und PGE₂ aus. Durch die starke Vasodilatation sinken der zentral venöse Druck und der Blutdruck. Da auch das Endothel selbst IL-1 sezerniert, wirkt es chemotaktisch (Borish, Steinke 2003:S462; Dinarello 1988b:27 ff.).

Durch die Stimulation mit IL-1 und TNF- α wird auch **Interleukin-6** sezerniert. Interleukin-6 kann nicht nur von Immunzellen, sondern auch von vielen anderen Zellen, wie Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Hepatozyten, Knochenmarkzellen und einigen Tumorzellen, produziert werden (Kishimoto 1989:2) und vermittelt die unterschiedlichsten Wirkungen. Es hat eine proinflammatorische Wirkung, indem es in der Leber die Herstellung der Akute-Phase-Proteine einleitet (Heinrich et al. 1990:625) und die Differenzierung von

B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen beeinflusst (Hirano et al. 1986:73). Auch bei der Aktivierung von T-Lymphozyten spielt es eine große Rolle, da es IL-2 (Garman et al. 1987:7629) und die Expression dessen Rezeptors induziert (Noma et al. 1987:249). Aber Interleukin-6 hat zudem noch antiinflammatorische Wirkungen. Über IL-6 kann der Körper das Ausmaß der systemischen und lokalen Immunantwort kontrollieren, da es die Menge der proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 und TNF- α reguliert. Es hat dabei aber keinen Einfluss auf die antiinflammatorischen Zytokine (Xing et al. 1998:318).

Im nachfolgenden Abschnitt wird ein kurzer Überblick über Chemokine gegeben. Chemokine sind kleine Proteinmoleküle (8–12 kDa), die für viele Zellen einen chemotaktischen Reiz darstellen (Borish, Steinke 2003:469). Anhand des N-terminalen Cysteinrestes werden die Chemokine in vier Untergruppen eingeteilt: CXC, CC, XC, CX₃C (Zlotnik, Yoshie 2000). Man kann Chemokine aber auch funktionell in zwei Gruppen einordnen:

1. Inflammatorische Chemokine werden nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen oder LPS ausgeschüttet und dienen der Rekrutierung von Monozyten, Granulozyten und T-Zellen. Außerdem leiten inflammatorische Chemokine auf Endothelzellen die Integrin-Produktion von Leukozyten ein.
2. Homöostatische Chemokine werden kontinuierlich produziert und dienen dazu, den physiologischen Fluss der Zellen aufrechtzuerhalten. Sie sind während der Hämopoese, Antigen-Produktion und letztendlich bei der Kontrolle des Immunstatus von Bedeutung (Moser, Loetscher 2001:123).

Im Folgenden soll besonders auf das Chemokin **CXCL8 (IL-8)** und die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten **murinen Chemokine CXCL1 und CXCL2** eingegangen werden.

CXCL8 ist der wichtigste chemotaktische Reiz für PMNs und wird in erster Linie von mononukleären Phagozyten, Endothel- und Epithelzellen ausgeschüttet. Die Synthese wird durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1, TNF- α oder auch LPS eingeleitet. Außer der chemotaktischen Wirkung trägt CXCL8 auch zur Degranulation von Neutrophilen, zum *respiratory burst* und zur Adhäsion

der Leukozyten mit dem Endothel via CD11b/CD18 bei (Baggiolini et al. 1989:1045). Nach Studien von Kurdowska et al. spielt Interleukin-8 in der Entstehung und bezüglich des *Outcomes* des ALI eine wichtige Rolle (Kurdowska et al. 2001:467). Die murinen Chemokine CXCL1 (*keratinocyte-derived chemokine*, KC) und CXCL2 (*macrophage inflammatory protein 2*, MIP-2) sind mit CXCL8 funktionell identisch (Olson, Ley 2002:R11).

1.5 Adenosin und akute inflammatorische Prozesse der Lunge

Das Nukleosid Adenosin kann unter physiologischen Bedingungen sowohl intrazellulär als auch extrazellulär nachgewiesen werden und hat im Körper verschiedene Funktionen. Es findet sich als Adenin in der Ribonucleinsäure (RNA) bzw. Desoxyribonucleinsäure (DNA) wieder, es dient zur intrazellulären Energiegewinnung. Außerdem spielt Adenosin als zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bei der intrazellulären Signalgebung eine Rolle. Extrazellulär kann Adenosin über Rezeptoren unterschiedlichste Wirkungen vermitteln (Fredholm 2007:1317 ff.). Es gibt vier verschiedene Adenosinrezeptoren (AR): A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃. Dabei handelt es sich um membrangebundene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die sich auf fast allen Zellen wiederfinden (Fredholm et al. 2001a:532 ff.). Linden (2005) fasst die unterschiedlichen Wirkungen von Adenosin an allen vier Rezeptoren in vier Gruppen zusammen:

1. Adenosin kann z. B. durch Vasodilatation das Verhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf verbessern.
2. Adenosin bewirkt die ischämische Präkonditionierung.
3. Adenosin stimuliert die Angiogenese.
4. Adenosin kann sowohl anti- als auch proinflammatorisch im Immunsystem wirken (Linden 2005:1385 ff.).

In Tabelle 3 sind die wichtigsten biologischen Effekte der einzelnen Adenosinrezeptoren nach Schepp und Reutershan (2008) nochmals aufgelistet.

Adenosin entsteht sowohl intra- als auch extrazellulär durch die Aufspaltung der Nukleotide Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP). Normalerweise ist die intrazelluläre Menge an Ade-

nosin und ATP höher als die extrazelluläre. Deswegen kommt es bei Zellzerstörungen, im Rahmen von Ischämie oder entzündlichen Prozessen zu einem Anstieg der extrazellulären Menge an Adenosin (Hasko, Cronstein 2004:33). Martin et al. konnten zeigen, dass die Plasmakonzentration von Adenosin bei Patienten mit septischem Schock 4–10 μM beträgt. Bei gesunden Probanden liegt die Konzentration unter 1 μM (Martin et al. 2000).

Tabelle 3: Biologische Funktionen der einzelnen Adenosinrezeptoren (vgl. Schepp, Reutershan 2008: 226). \uparrow = Erhöhung, \downarrow = Verminderung.

Funktion	
A₁	Bradykardie, Antinozizeption, ischämische Präconditionierung, \downarrow Lipolyse, \downarrow glomeruläre Filtration
A_{2A}	\downarrow Plättchenaggregation, Vasodilatation, Schutz vor ischämischen Schäden
A_{2B}	Relaxation glatter vaskulärer Muskelzellen, Stimulation der Ausschüttung von Mediatoren durch Mastzellen
A₃	\uparrow Ausschüttung von Mediatoren durch Mastzellen (Maus), Präconditionierung

Allerdings kann ATP auch über eine kontrollierte Ausschüttung in den extrazellulären Raum gelangen. Dies geschieht über Exozytose oder spezielle Kanäle. Das ATP wird im extrazellulären Raum in einer zweiteiligen Enzymreaktion in Adenosin aufgespalten. Im ersten Schritt werden ATP und ADP mit der Ekto-Apyrase (CD39) in AMP und im zweiten Schritt von AMP mittels der Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) in Adenosin und einen Phosphatrest aufgespalten (Fredholm 2007:1315). Reutershan et al. zeigen, dass die Transkriptmengen von CD39 und CD73 beim LPS-induzierten ALI steigen, sich PMNs von CD39- und CD73-gendefizienten Mäusen verstärkt im Interstitium und im intraalveolären Raum anreichern (Reutershan et al. 2009:475 f.). Hieraus ergibt sich eine wichtige Rolle des extrazellulären Adenosins bei der Migration neutrophiler Granulozyten im Rahmen des ALI/ARDS. Adenosin trägt unter anderem dazu bei, die Einwanderung der PMNs in die Lunge abzuschwächen (Chignard, Balloy

2000; Reutershan et al. 2009; Reutershan et al. 2007; Reutershan et al. 2006; Schingnitz et al. 2010).

Der A_{2B} -Adenosinrezeptor ($A_{2B}AR$) hat von den vier oben genannten Adenosinrezeptoren die schwächste Affinität für Adenosin. Deswegen wird er unter physiologischen Normalbedingungen im Gegensatz zu den anderen Adenosinrezeptoren nicht aktiviert. Da während einer Entzündungsreaktion die extrazelluläre Menge an Adenosin aufgrund von Zellstress, Zellzerstörung und Hypoxie ansteigt, wird $A_{2B}AR$ erst unter einem Entzündungsgeschehen aktiviert (Fredholm et al. 2001b:446). Man findet $A_{2B}AR$ auf pulmonalem Epithel (Cagnina et al. 2009:L471), vaskulärem Endothel sowie auf Entzündungszellen (Yang et al. 2006:1916). Bei einer Aktivierung von $A_{2B}AR$ kommt es sowohl zu pro- als auch antiinflammatorischen Effekten. In Studien konnte gezeigt werden, dass bei der Stimulation von $A_{2B}AR$ auf humanen Mastzellen die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-3, IL-4, IL-8 und IL-13 steigt (Feoktistov, Biaggioni 1995:1984; Ryzhov et al. 2004:7731). Auch ist belegt, dass glatte Muskelzellen der Atemwege vermehrt *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) und IL-6 ausschütten (Zhong et al. 2004:123). Des Weiteren zeigten Sun et al., dass die Antagonisierung von $A_{2B}AR$ den Anstieg proinflammatorischer Zytokine vermindert (Sun et al 2006:2179 f.). Die verstärkte Ausschüttung von IL-6 nach Stimulation von $A_{2B}AR$ ist nicht auf Lungenzellen beschränkt, sondern findet sich zum Beispiel auch in Osteoblasten (Evans et al. 2006:235), intestinalen Epithelzellen (Sitaraman et al. 2001:863) und Astrozytomzellen (Fiebich et al.1996:1430).

Eine antiinflammatorische Wirkung des A_{2B} -Adenosinrezeptors konnte mit der Hilfe von $A_{2B}AR$ -Knock-out- (K.o.-)Mäusen nachgewiesen werden. So wurde gezeigt, dass $A_{2B}AR$ auf Endothelzellen vor einer Entzündungsreaktion und vermehrter Adhäsion neutrophiler Granulozyten am Endothel schützt (Yang et al. 2006). Eckle et al. zeigten, dass die Lungenschädigung bei $A_{2B}AR$ -Knock-out-Mäusen mit Hypoxie-induziertem ALI deutlich stärker war als bei den Wildtypmäusen (Eckle et al 2008a). Auch die proinflammatorischen Zytokine stiegen und die antiinflammatorischen Zytokine sanken (Eckle et al. 2008b). Untersuchungen von Schingnitz et al. (2010) wiesen nach, dass bei einer Endotoxin-

induzierten Lungenschädigung vermehrt $A_{2B}AR$ exprimiert wird und IL-1-, IL-6- sowie TNF- α -Transkripte in den K.o.-Mäusen signifikant höher waren als in den Wildtypmäusen (Schingnitz et al. 2010).

1.6 Fragestellungen der Arbeit

Acute Lung Injury und ARDS sind auch heute noch aufgrund der hohen Sterblichkeit und der wenigen therapeutischen Optionen in der kausalen und supportiven Behandlung von großem Interesse für die Forschung. Auch die Pathophysiologie ist bis heute nicht vollständig geklärt (vgl. Kapitel 1.1). Adenosin kommt in der Pathogenese von ALI/ARDS eine entscheidende Rolle zu. Extrazelluläres Adenosin wirkt auf die Migration neutrophiler Granulozyten und steht so im Zusammenhang mit akuten inflammatorischen Prozessen der Lunge (vgl. Kapitel 1.5). Diese Dissertation widmet sich daher der Frage, welche Rolle extrazelluläres Adenosin über die Wechselwirkung mit $A_{2B}AR$ in akuten inflammatorischen Prozessen der Lunge spielt.

Folgende Fragestellungen sollten mit dieser Arbeit untersucht werden:

- Welchen Einfluss hat der A_{2B} -Adenosinrezeptor auf die histologisch bzw. immunhistochemisch nachweisbare Entzündungsreaktion in der Lunge nach LPS-Stimulation?
- Welche Rolle spielt der A_{2B} -Adenosinrezeptor bei der Migration neutrophiler Granulozyten *in vivo*? Lässt sich eine pro- oder antiinflammatorische Wirkung nachweisen? Welcher Migrationsschritt wird beeinflusst – transepithelial und/oder transendothelial?
- Welchen Einfluss hat der A_{2B} -Adenosinrezeptor auf die Permeabilität der alveolär-kapillären Membranen *in vivo*?
- Führt die Aktivierung des A_{2B} -Adenosinrezeptors zu einer Veränderung der Freisetzung chemotaktischer Zytokine bzw. Chemokine?
- Ergeben sich durch Aktivierung bzw. Inhibierung des Rezeptors therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung akut inflammatorischer Prozesse der Lunge, wie ALI und ARDS?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Mäusestämme und Zellen

Die A_{2B}AR-Knock-out-Mäuse für die In-vivo-Versuche wurden von der Boston University, School of Medicine Department of Biochemistry (Boston, USA) bezogen, die korrespondierenden Wildtyp-Mäuse C₅₇Bl/6 von Charles River (Sulzbach). Die verwendeten Versuchstiere waren männlich und zwischen acht und zwölf Wochen alt. Die Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Genehmigungsnummer A1/06).

Die In-vitro-Transmigrationsversuche wurden mit humanen respiratorischen Epithelzellen vom Typ A549 von ATCC (CCL-185), LGC Standards (Wesel) durchgeführt. Die des Weiteren verwendeten humanen Endothelzellen der Lunge vom Typ HMVEC-L (*Human Lung Microvascular Endothelial Cells*) stammten von Lonza (CC-0264, Köln).

2.1.2 Geräte

Absaugpumpe Vario Vacuubrand BVC 21	Vacuubrand, Wertheim
Autoklav HICLAVE HV-25	HMC, Tüßling
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000 Elite	MDS Nordion, Kanada
Brutschrank cytoperm2	Heraeus, Hanau
Dispergierantrieb MICCRA D-9	ART Prozess- und Labortechnik, Müllheim
Dispergierwerkzeug DS-8/P	ART Prozess- und Labortechnik, Müllheim
Durchflusszytometer FACSort	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine AF-10	Scotsman, Sprockhoevel
Gewebeinfiltrationsautomat TP1050	Leica biosystems, Nussloch
Histoembedder EG 11160	Leica biosystems, Nussloch
ICycler Base	Bio-Rad Laboratories, München

Materialien und Methoden

Inkubationswasserbad Typ 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Labor-pH-Meter 526	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Mehrkanalpipette (3114000158)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop: Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Mikroskop: Leitz DM-IRB	Leica, Wetzlar
Mikrowelle Cookmate	DEAWOO, Butzbach
Multipette Plus (4981000.019)	Eppendorf, Hamburg
Photometer GENios	Tecan, Crailsheim
Photometer Ultraspec 3000 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Frei- burg
Pinzetten (BD312R, BD311R)	Aesculap, Tuttlingen
PipetBoy acu (155000)	INTEGRA Bioscience, Fernwald
Pipetten (0.1-2500 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plate washer Columbus Plus	Tecan, Crailsheim
Quantimet 600	Leica, Wetzlar
Rotationsmikrotom RM 2235	Leica biosystems, Nussloch
Scheren (BC590R, BC060R)	Aesculap, Tuttlingen
Steril Bank Leimin-Air HB 2472	Heraeus, Hanau
Thermocycler Cyclone 25	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Thermomixer 5439	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler AK 82	INFORS AG, Bottmingen (CH)
Ultraschall Sonoplus GM 70	Bandelin electronic, Berlin
Vernebler MICRO-A-I-R U22	OMRON Healthcare, Illinois (USA)
Vortex K-55-GE	Bender und Hobein AG, Zürich (CH)
Waage HR-120-EC	A&D Instruments Ltd., Ahrensburg
Waage Scout II	Ohaus, Kirchheim
Wärmeplatte HI 1220	Leica biosystems, Nussloch
Wasserbad HI 1210	Leica biosystems, Nussloch
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

Materialien und Methoden

2.1.3 Materialien

Abdecktuch steril Folioplast (992495/0)	Hartmann, Heidenheim
Cell culture tube 12 ml, steril (163160)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Citrat-Monovetten	Sarstedt, Nürnberg
Combitips Plus 10 ml (0030069.269)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser (01-2460/1)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Einbettkassetten Rotilapo (K.113.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Einweg-Pasteurpipetten (EA70.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Färbeeinsatz (11-0002)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Färbeküvette (11-0001)	R.Langenbrinck, Emmendingen
GAZIN Mullkompressen (18501)	Lohmann & Rauscher, Neuwied
GAZIN Mullkompressen steril (13620)	Lohmann & Rauscher, Neuwied
Glasröhrchen No. 2775/6 75 x 12 mm	Assistent, Sondheim
Glaspasteurpipetten 150 mm	WU, Mainz
Handschuhe DermaClean (PFC4303971)	Ansell, München
Handschuhe steril Biogel	Regent Medical, Braunschweig
ImmEdge Hydrophobic Barrier	
Pen (H-4000)	Vector Labs, Peterborough (UK)
Kanüle Safety-Multifly 21G (851638235)	Sarstedt, Nürnberg
Kanülen Microlance 20 G (301300)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 24 G (304100)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 25 G (300400)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 27 G (302200)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen 1,8 ml Nunc (368632)	Thermo Scientific, Bonn
Mikrotiterplatte Microplate (655101)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrotiterplatte Nunc Maxisorp (442404)	Thermo Scientific, Bonn
Mikrotomklinge S35	Feather, Tokyo (J)
Nähgarn Mercifil No 50 (M3541)	Amann und Söhne, Bönningheim
Objektträger (03-0004)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger Superfrost Plus (03-0060)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Parafilm

Materialien und Methoden

PCR-Platte Mplri-Rigid Ultra Plates (N421.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen Cellstar (627160)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen Cellstar (628160)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen Cellstar (633171)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl (70.1115)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 1000 µl (686290)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 200 µl (0030.000.870)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 200 µl (70760002)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 2000 µl (K315.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Polypropylenröhrchen 15 ml (188271)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 50 ml (352070)	Becton Dickinson, Heidelberg
Polystyrenröhrchen 5 ml (352052)	Becton Dickinson, Heidelberg
Quarzglasküvetten (105-200-QS)	Hellma, Müllheim
Reaction-tubes 1,5 ml (616201)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reagent Reservoir 50 ml (4870)	Corning Incorporated, NY (USA)
Rotilabo Probenröhrchen (5866.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Safe-lock tubes 0,5 ml (0030121023)	Eppendorf, Hamburg
Spritze 1 ml (300013)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritze Injekt 10 ml (4606108V)	Braun, Melsungen
Spritze Injekt 2 ml (4606027V)	Braun, Melsungen
Spritze Injekt 5 ml (4606051V)	Braun, Melsungen
Stripetten 1 ml (356521)	Becton Dickinson, Heidelberg
Stripetten 10 ml (356551)	Becton Dickinson, Heidelberg
Stripetten 25 ml (356525)	Becton Dickinson, Heidelberg
Stripetten 5 ml (356543)	Becton Dickinson, Heidelberg
Transwell Plate 24 well (3472-Clesar)	Corning Incorporated, Wiesbaden
Venenkatheter Insyte 22 G (381223)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zählkammer C-Chip (DHC-N01)	Digital Bio, Seoul (ROK)
Zellkulturflasche für A549 (90076)	TPP, Trasadingen (CH)
Zellkulturflasche für HMVEC-L (3290)	Corning Incorporated, NY (USA)
Zellsiebe Cell Strainer 70 µm (352350)	Becton Dickinson, Heidelberg

Materialien und Methoden

2.1.4 Chemikalien

ABTS (A1888-2G)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Citronensäure (818707)	Merck, Darmstadt
DAB Chromogen (S3000)	Dako, Hamburg
EDTA (ED4S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Evans blue (206334-10G)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid (F9037)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H ₂ SO ₄ (100731)	Merck, Darmstadt
HCl (100319)	Merck, Darmstadt
KCl (4936)	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (4873)	Merck, Darmstadt
Na ₂ -EDTA (A2937)	AppliChem, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ (6580)	Merck, Darmstadt
Na-Citrat (35801)	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl (106404)	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃ (K10720529)	Merck, Darmstadt
NaOH (9913)	Merck, Darmstadt
NH ₄ Cl (A0988)	AppliChem, Darmstadt
PBS (D5652)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PFA 4 % (P6148)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium-Acid (S-8032)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid 30 % (108597)	Merck, Darmstadt

2.1.5 Lösungen, Medien und Zusätze

1 %-Antibiotic-Antimycotic-Solution (A5955)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ascorbic Acid (CC-4116B)	Lonza, Köln
Avidin Blocking Kit (SP-2001)	Vector Labs, Peterborough (UK)
Bluing Reagent (7301)	Thermo Scientific, Bonn
BSA (100018)	Boehringer, Mannheim
Diff-Quik (130832)	Medion Diagnostics, Düdingen (CH)

Materialien und Methoden

DMSO (D5879)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DPBS without Mg/Ca (14190094)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
EBM-2 (CC-3156)	Lonza, Köln
Eosin (X883.2)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut (A3678)	AppliChem, Darmstadt
Eukitt (03989)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
F-12 Ham's (21765)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
FBS (CC-4102B)	Lonza, Köln
FCS Gold (A15151)	PAA Laboratories, Cölbe
Formalin 4 % (A3697)	AppliChem, Darmstadt
FSGO Gelatin (G7765)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GA-1000 (CC-4381)	Lonza, Köln
Glycerin (1.04094)	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin (GHS316)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HBSS (14025050)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
HBSS without Mg/Ca (14175053)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Hydrocortisone (CC-4112B)	Lonza, Köln
L-Glutamin (25030-24)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
LPS (L6011)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol (106009)	Merck, Darmstadt
NFW (73989)	AppliChem, Darmstadt
Paraffin Rotiplast (6642.5)	Carl Roth, Karlsruhe
PEG Polyethylenglycol (202398)	Sigma, Taufkirchen
Percoll Plus (17-0891-01)	GE Healthcare, München
R ³ -IGF-1 (CC-4115B)	Lonza, Köln
Reagent Diluent (DY995)	R&D Systems, Wiesbaden
Recombinant murine MIP-2 (25015)	PeptoTech, Hamburg
rhEGF (CC-4317B)	Lonza, Köln
rhFGF (CC-4113B)	Lonza, Köln
RPMI-1640 (R7509)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Substrat Solution (DY999)	R&D Systems, Wiesbaden
Triton X-100 (A4975)	AppliChem, Darmstadt

Materialien und Methoden

Trypsin/EDTA Solution (CC-5012)	Lonza, Köln
Trypsin Neutralizing Solution (CC 5002)	Lonza, Köln
Türk's Lösung (109277)	Merck, Darmstadt
Tween 20 (A4974)	AppliChem, Darmstadt
Unmasking Solution (H-3300)	Vector Labs, Peterborough (UK)
VEGF (CC-4114B)	Lonza, Köln
Xylol (9713.3)	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.6 Enzyme

Accutase (L11-007)	PAA Laboratories, Cölbe
Collagenase XI (C7657)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNAse (D4527)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hyaluronidase (H3506)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
iScript cDNA Synthesis Kit (170-8891)	Bio-Rad Laboratories, München
Nucleo Spin RNA II (740955.250)	Mercherey-Nagel, Düren

2.1.7 Medikamente

Atropinsulfat 0,5 mg/ml	Ratiopharm, Ulm
CotrimE 480 mg/5 ml	Ratiopharm, Ulm
Desinfektionsspray Softasept	Braun, Melsungen
Heparin-Natrium 25000 I.E./5 ml	Ratiopharm, Ulm
Ketamin 50 mg/ml	Ratiopharm, Ulm
NaCl 0,9 % 10 ml	Braun, Melsungen
NaCl 0,9 % 100 ml	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Rompun 2 % (25 ml Xylazin) 20 mg/ml	Bayer, Leverkusen

2.1.8 Antikörper, Marker, Primer

7/4 FITC (MCA771F)	AbD Serotec, Düsseldorf
Biotinylated rabbit anti rat (BA-4001)	Vector Labs, Peterborough (UK)
CD45 PerCP (557235)	Becton Dickinson, Heidelberg

Materialien und Methoden

DuoSet ELISA IL-6 (DY 406)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA KC (DY 453)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA MIP-2 (DY 452)	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet ELISA TNF- α (DY 410)	R&D Systems, Wiesbaden
Gr1 (RB6-8C5)	Lymphocyte Culture Center Core, University of Virginia, Charlottesville (USA)
IgG 2a FITC (553929)	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG 2b APC (553991)	Becton Dickinson, Heidelberg
Mus A _{2B} left	
5'-ggg cag caa ctc aga aaa ct-3'	biomers.net, Ulm
Mus A _{2B} right	
5'-gga agg act tcg tct ctc ca-3'	biomers.net, Ulm
Mus β -Aktin left	
5'-tca cgc acg att tcc ctc tca g-3'	biomers.net, Ulm
Mus β -Aktin right	
5'-ctc tcc ctc acg cca tcc tg-3'	biomers.net, Ulm
Rat anti mouse neutrophils (MCA771GA)	AbD Serotec, Düsseldorf
Selektiver A _{2B} -Agonist BAY 60-6583	Bayer, Wuppertal
Selektiver A _{2B} -Antagonist	
PSB 1115 (P0373)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sybr.-Green Supermix (170-8880)	Bio-Rad Laboratories, München
Vectastain ABC-KIT (PK-4004)	Vector Labs, Peterborough (UK)

2.2 Methoden

2.2.1 Real-time reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Grundlagen

Die RT-PCR ist ein zweiteiliges Verfahren, das seine Anwendung in Forschung und Diagnostik findet. Es besteht aus den Verfahren der reversen Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR).

Das Verfahren der reversen Transkription erlaubt es, RNA in DNA umzuwandeln. Reverse Transkriptasen werden daher auch als RNA-abhängige DNA-Polymerasen bezeichnet und sind Enzyme, welche die Umwandlung von RNA in DNA katalysieren. Dabei wird von einer einzelsträngigen RNA ein RNA-DNA-Hybridstrang gebildet. Diese DNA wird deswegen auch c (*complementary*) DNA genannt. Um letztendlich eine doppelsträngige DNA zu erhalten, werden zusätzlich DNA-abhängige DNA-Polymerasen benötigt. 1970 wurde die reverse Transkriptase gleichzeitig von Howard Temin und David Baltimore entdeckt (Drake, Crow 1996:3).

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, um DNA in vitro zu vervielfältigen. Dieses Verfahren wurde 1983 von Kary B. Mullis erfunden und 1986 erstmals publiziert (Mullis et al. 1986). Bei der PCR wird die DNA mithilfe des Enzyms DNA-Polymerase künstlich vervielfacht. Dabei bindet das Enzym an einen DNA-Einzelstrang und beginnt an kurzen komplementären Oligonukleotiden, *Primer* genannt, den zum verwendeten Einzelstrang komplementären Strang mittels Desoxyribonukleosidtriphosphaten zu synthetisieren. Danach werden die Proben auf 94–96 °C erhitzt, die Wasserstoffbrückenbindungen zerfallen und es entstehen wieder Einzelstränge. Die schematische Darstellung der PCR ist Abbildung 3 zu entnehmen. Ursprünglich verwendete Mullis die DNA-Polymerase I aus E.coli. Diese denaturierte allerdings beim Erhitzen und musste so vor jedem neuen Zyklus hinzugefügt werden. Eine deutliche Verbesserung des Verfahrens brachte die thermostabile DNA-Polymerase, die aus dem in heißen Quellen lebenden thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wurde. Diese thermostabile DNA-Polymerase wird auch Taq-Polymerase genannt (Saiki et al 1988:487; Mullis 1990).

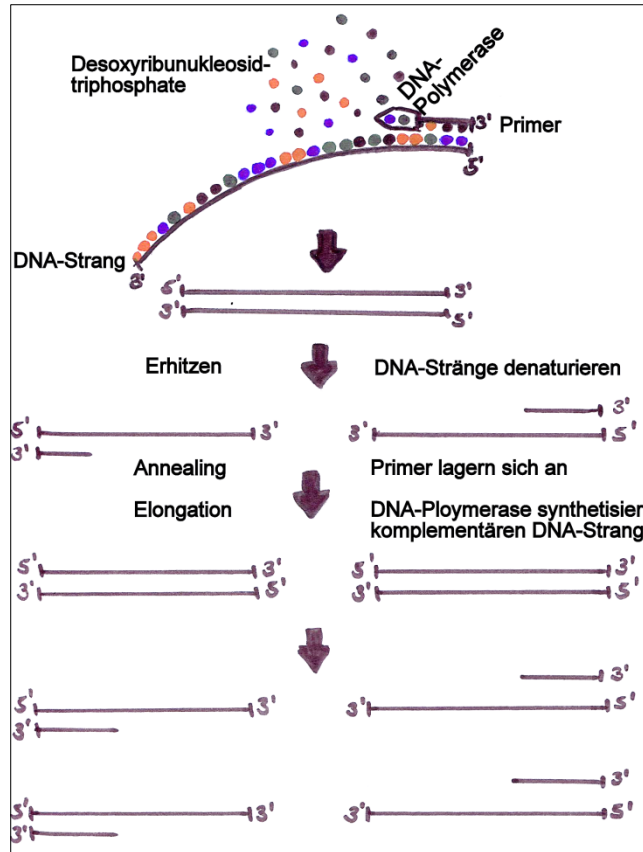


Abbildung 3: Schematische Darstellung der PCR

RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wird die Lunge der Versuchsmaus entnommen (vgl. Kapitel 2.2.7, Präparation der Lunge) und im Lysepuffer homogenisiert (vgl. Kapitel 2.2.9, Evans Blue).

Lysepuffer:	RA-1	350 µl
	β-Mercaptoethanol	3,5 µl

Die für die Isolierung verwendeten Lösungen, Reaktionsgefäße und Filter sind im Nucleo Spin RNA II Kit von Mercherey-Nagel enthalten. Es dürfen maximal 30 mg des Lungengewebes pro Probe verwendet werden.

Durch die Lyse werden die Disulfidbrücken aufgebrochen. Das Zelllysate wird mit einer Pipette aufgezogen, auf ein mit Filter versehenes Reaktionsgefäß gegeben und bei 11 000 g für 1 min zentrifugiert. Auf dem Filter bleibt der Zellschrot haften und kann verworfen werden. Zur Ausfällung der DNA werden nach der Zentrifugation 350 µl 70-prozentiges Ethanol zugegeben. Die Probe wird so

lange gemischt, bis keine Schlieren mehr vorhanden sind, und auf ein neues – ebenfalls mit Filtern versehenes – Reaktionsgefäß gekippt, das für 30 s bei 11 000 g zentrifugiert wird. Danach wird der Durchfluss im Reaktionsgefäß verworfen. Die RNA und DNA sind nun fest an die Filtermembran gebunden. Zur Trocknung der Membran werden 350 µl Membran Desalting Buffer auf den Filter gegeben und die Probe 1 min bei 11 000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wird erneut verworfen. Um die restliche DNA in RNA aufzuspalten, werden 95 µl DNase-Lösung auf die Membran pipettiert und bei Raumtemperatur (RT) 15 min inkubiert.

DNase-Lösung:	DNase I	10 µl
	DNase reaction buffer	90 µl

Nach der Inkubation werden 200 µl RA-2-Puffer zur Inaktivierung der DNase hinzupipettiert. Nachdem die Probe bei 11 000 g für 30 s zentrifugiert wurde, wird der Durchfluss verworfen und 600 µl RA-3-Puffer zugegeben. Der letzte Schritt wird mit 250 µl RA-3-Puffer wiederholt. Zur vollständigen Trocknung der Membran wird die Probe 2 min bei 11 000 g zentrifugiert und der Filter auf ein neues 1,5-ml-Eppendorf-Cup gesetzt.

Um die RNA vom Filter in das Eppendorf-Cup zu eluieren, werden 40 µl NFW (nukleasefreies Wasser) auf den Filter gegeben und bei 11 000 g für 1 min zentrifugiert. Zur Messung der Proben am Photometer wird die RNA 1:100 mit NFW verdünnt und in eine Quarz-Küvette gefüllt. Vor Beginn der Messungen wird mit 100 µl NFW der Nullabgleich vorgenommen.

Umschreibung der RNA in cDNA

Zur Umschreibung wird das iScript cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad verwendet. Dieses besteht aus iScript reaction mix, iScript Reverse-Transkriptase und NFW. Für den Umschrieb von RNA in cDNA muss exakt 1 µg der isolierten RNA eingesetzt werden. Anhand der zuvor gemessenen Photometerkonzentrationen (µg/ml) wird berechnet, wie viel NFW zur RNA-Lösung gegeben werden muss. RNA-Lösung und NFW müssen zusammen 15 µl ergeben. Für die Reaktion werden pro Probe 4 µl iScript reaction mix und 1 µl iScript Reverse-Transkriptase in kleine Eppendorf-Cups vorgelegt, dann die 15 µl RNA-NFW-

Lösung dazupipettiert. Die Umschreibung erfolgt im Thermocycler für 40 min. Anschließend werden 60 µl NFW auf jede Probe gegeben.

PCR

Zur Vorbereitung der PCR werden mehrere Lösungen benötigt. Es werden zwei Primer-Mix-Lösungen hergestellt:

1. Forward und Reverse Primer des A_{2B}AR-Gens und
2. Forward und Reverse Primer des Kontrollgens, β-Aktin.

Die eingesetzten Primer (vgl. Kapitel 2.1.8, Antikörper, Marker, Primer) müssen so gelöst sein, dass sie dieselbe Konzentration haben.

Primer-Mix:	NFW	160 µl
	Forward Primer	20 µl
	Reverse Primer	20 µl

Für die Standardreihen (A_{2B}AR und β-Aktin) werden je vier Verdünnungen hergestellt: 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16. Die Standardreihe für A_{2B}AR wird aus der Probe der Kontrolle, d. h. aus der cDNA der Maus, die kein LPS erhalten hat, hergestellt.

Für die PCR werden je Probe 21 µl PCR-Mix verwendet.

PCR-Mix:	Sybr-Green	12 µl
	NFW	7,5 µl
	Primer-Mix (A _{2B} AR od. β-Aktin)	1 µl

Nach den Vorbereitungen werden jeweils 4 µl der Proben und Verdünnungen der Standardreihen in die *wells* (Vertiefungen) der 96-well-PCR-Platte vorgelegt. Die β-Aktin-Proben werden in Duplikaten, die A_{2B}AR-Proben und die Verdünnungsreihen beider Standards in Triplikaten auf die Platte pipettiert. Vier Mikroliter Probe enthalten 50 ng der cDNA. Dazu werden 21 µl des entsprechenden PCR-Mix gegeben und die Real-time-PCR im iCycler gestartet. Die Ergebnisse werden mit Gene Expression Analysis for iCycler iQ Real-time-PCR Detection System von Bio-Rad ausgewertet.

2.2.2 Differentialblutbild

Mittels Biopsieschnitt werden ca. 10 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen und auf die Zählkammer aufgebracht. Die Leukozyten werden zur Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) pro ml (Anzahl Leukozyten x 2,5 x 10 x 1000) ausgezählt.

Zur Anfertigung des Differentialblutbildes wird ein Blutropfen auf einen unbeschichteten Objektträger aufgebracht und ausgestrichen. Die getrockneten Ausstriche werden mit Diff-Quik nach Herstellerangaben gefärbt und getrocknet. Mikroskopisch werden die Leukozyten bis zu einer absoluten Zellzahl (ZZ) von 100 differenziert.

2.2.3 Histologie

Entnahme und Formalinfixierung der Lungen

Die Maus wird narkotisiert, das Fell abpräpariert und der Thorax eröffnet. Die Trachea der Maus wird mittels Venenverweilkatheter kanüliert (vgl. Kapitel 2.2.6, Bronchoalveoläre Lavage). Über den Katheter wird aus einer 20-ml-Spritze vierprozentiges Formalin passiv über 15 min in die Lunge infundiert. Der Formalinpegel der Spritze sollte hierbei nicht mehr als 20 cm über der Maus sein, um erhöhten Druck auf das Lungengewebe zu vermeiden. Die Lunge wird entnommen und in einer Einbettkassette für 24 Stunden in vierprozentigem Formalin belassen.

Einbetten der Lunge

Nach der Formalinfixierung wird die Lunge 30–60 min in 70-prozentigem Ethanol entwässert und anschließend das Lungengewebe im Gewebeeinfiltrationsautomat (Leica) in Paraffin eingebettet. Um die Lunge am Mikrotom schneiden zu können, wird diese am Histoembedder (Leica) in einen Paraffinblock gegossen.

Gewebeschnitte

Am Rotationsmikrotom (Leica) werden die mit Eis gekühlten Paraffinblöcke in 10 µm dicke Schnittketten geschnitten und mit einem Pinsel vorsichtig ins 40 °C

warme Wasserbad übertragen. Im Wasserbad wird die Kette nach Bedarf in Einzelschnitte unterteilt, auf Objektträger gezogen und über Nacht auf der Wärmeplatte bei 37 °C getrocknet.

Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Für die Hämatoxylin/Eosin- (HE)Färbung werden die Paraffinschnitte zuerst in Xylol für zweimal 5 min, dann in absteigenden Alkoholkonzentrationen (Ethanol zweimal 100 %, 96 %, 70 %, 50 %) für jeweils 3 min entparaffiniert. Danach werden die Schnitte 5 min in Aqua dest. gespült und für 10 min mit Hämatoxylin gefärbt, kurz in einprozentigen HCl-Alkohol getaucht, danach 15 min unter fließendem Wasser gebläut und 1 min mit Eosin gefärbt. Über aufsteigende Alkoholkonzentrationen (Ethanol je zweimal 70 %, 90 % und 100 % für 3 min; zuletzt Xylol für 5 min) werden die Schnitte entwässert, mit Eindeckmedium eingebettet und getrocknet.

Immunhistochemie

Die Paraffinschnitte werden zuerst in Xylol für 10 min, dann in absteigenden Alkoholkonzentrationen (Ethanol je zweimal 100 %, 96 %, 70 %) für je 5 min entparaffiniert und zweimal in Aqua dest. je 5 min gespült. Zum Blocken der endogenen Peroxidase wird der Objektträger für 30 min in einer Lösung aus 200 ml Methanol und 3 ml 30-prozentigem Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur inkubiert, dann 5 min in Aqua dest. gespült. Die Präparate werden mit Unmasking Solution überdeckt und in der Mikrowelle bei 600 W für 20 min belassen. Dabei wird regelmäßig die Flüssigkeit im Objektträgerbehälter aufgefüllt, damit die Präparate nicht austrocknen. Nach dem Erhitzen werden die Objektträger circa eine Stunde zum Abkühlen zugedeckt belassen. Danach werden sie 5 min in PBS⁻ gespült. Auf den abgekühlten Objektträgern werden die Schnitte mit Pap Pen eingekreist und innerhalb der Kreise mit Avidin Blocking Solution bedeckt.

Avidin Blocking Solution:	0,5 % FSGO/PBS ⁻	1 ml
	Normal rabbit serum (NRS)	100 µl
	Avidin Blocking Solution	4 Tropfen

Materialien und Methoden

(Die hergestellten Lösungen reichen für einen Objektträger. Werden mehr Objektträger verwendet, müssen die Mengenangaben entsprechend der Anzahl der Objektträger angepasst werden.)

In einer feuchten Kammer werden die Objektträger bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Danach wird die Avidin Blocking Solution abgekippt, die Objektträger 5 min in PBS⁻ gespült und zuletzt der Primär-Antikörper (AK) (Biotin Blocking Solution) aufgetragen.

Biotin Blocking Solution:	Primär-AK (1 µg/ml)	1 µl
	0,5 % FSGO/PBS ⁻	1 ml
	Normal rabbit serum (NRS)	100 µl
	Biotin Blocking Solution	4 Tropfen

Die Objektträger werden mit Biotin Blocking Solution über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Der Primär-AK wird abgekippt, der Objektträger für 5 min in fünfprozentigem FSGO/PBS⁻ gespült und der Sekundär-AK aufgebracht. Die Objektträger werden mit Sekundär-AK für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.

Sekundär-AK :	Sekundär-AK	10 µl
	0,5 % FSGO/PBS ⁻	1 ml
	Normal rabbit serum (NRS)	100 µl

Der Sekundär-AK wird abgekippt, der Objektträger für 5 min in fünfprozentigem FSGO/PBS⁻ bei RT gespült. Die ABC-Solution wird nach Angaben des Herstellers angesetzt, auf die Präparate aufgetragen und für 30 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abkippen der ABC-Solution und erneutem Spülen (5 min) der Präparate in fünfprozentigem FSGO/PBS⁻, wird die DAB-Lösung angesetzt, auf die Schnitte aufgetragen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

DAB-Lösung:	PBS ⁻	10 ml
	DAB	1 Tablette

Die DAB-Solution wird 30 min im Dunkeln gemischt. Unmittelbar vor Gebrauch werden 7,5 µl H₂O₂ hinzugefügt.

Die DAB-Lösung wird nach der Inkubation abgekippt und die Objektträger 5 min in Aqua dest. gespült. Nach Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin für 15 s werden die Präparate 4–5 min unter fließendem Leitungswasser gespült, 1 min mit Bluing Reagent gebläut und unter fließendem Leitungswasser für 3 min gespült. Über die aufsteigenden Alkoholkonzentrationen und Xylol werden die Schnitte wieder entwässert und zuletzt mit Eindeckmedium eingedeckt.

2.2.4 Inhalation von Lipopolysaccharid

Zur Induktion einer transienten pulmonalen Inflammation wird die Inhalation von aerosolisiertem LPS (*Salmonella enteritidis*) angewandt. Die Inhalation simuliert Aspekte einer Pneumonie mit wesentlichen Merkmalen einer akuten respiratorischen Insuffizienz.

Die LPS-Lösung besteht aus 7 ml LPS (0,5 mg/ml, gelöst in PBS⁻) + 7 ml NaCl 0.9 %. Der Aufbau der Inhalationskammer ist in Abbildung 4 dargestellt.

Es werden vier bis maximal acht Mäuse gleichzeitig in die Inhalationskammer gesetzt. Das LPS-Aerosol wird vom Vernebler über den Plastikschlauch Nr. 1 in die Kammer geleitet. Dies geschieht über eine Sogwirkung an Gummischlauch Nr. 2 durch fließendes Wasser an Gummischlauch Nr. 3. So wird die gleichmäßige Verteilung des Aerosols sowie die Luftzufuhr für die Mäuse gewährleistet. Die LPS-Inhalation dauert 30–50 min bis zur vollständigen Entleerung des Verneblers.

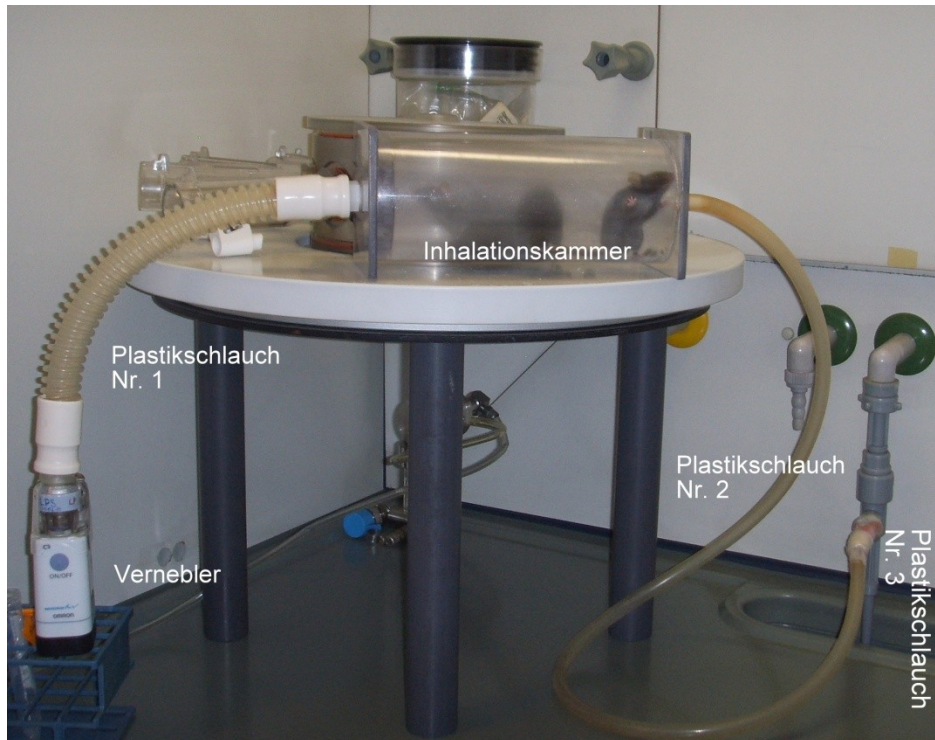


Abbildung 4: Inhalationskammer zur LPS-Applikation. Aerosol wird über Plastikschauch Nr. 1 durch Sogwirkung an Plastikschauch Nr. 2 vom Vernebler in die Inhalationskammer geleitet.

2.2.5 Behandlung mit Agonist/Antagonist von $A_{2B}AR$

Der $A_{2B}AR$ -Agonist (BAY 60-6583) oder -Antagonist (PSB 1115) wird der Maus 60 min vor Versuchsbeginn bzw. vor LPS-Gabe in entsprechender Dosis intraperitoneal (i. p.) verabreicht.

Agonist: 1 und 2 mg/kg Körpergewicht (KG), gelöst in 80 % PEG, 10 % Glycerin, 10 % Aqua ad injectabilia.

Antagonist: 10 mg/kg KG; gelöst in DMSO und weiterverdünnt mit NaCl 0,9 %.

2.2.6 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Der Versuchsmaus werden 300 μ l des gefärbten Antikörpers Gr-1 intravenös (i. v.) und anschließend 300 μ l der Narkoselösung i. p gespritzt.

Anästhesie: Ketamin 200 μ l
 Rompun 2 % 50 μ l

Materialien und Methoden

Atropin	40 µl
NaCl 0,9 %	710 µl

(Die Narkoselösung reicht für drei Mäuse.)

Nach 5 min wird die Maus mit Kanülen oder Pflasterstreifen an den Extremitäten fixiert. Vor der Fellpräparation wird das Tier mit 70-prozentigem Alkohol eingesprüht und abgewischt. Abdomen und Thorax werden eröffnet. Zum Ausbluten wird die Vena cava infradiaphragmal durchtrennt und die rechte Herzkammer mit 3 ml PBS⁻ perfundiert. Die Trachea wird freipräpariert und mit einem Venenkatheter kanüliert. Über die Kanüle wird 1 ml PBS⁻ mit einer Insulinspritze langsam in das Bronchialsystem injiziert und folgend aspiriert. Dieses Prozedere wird wiederholt, bis 5 ml BAL in einem Falcon auf Eis gesammelt sind. Die BAL wird zentrifugiert (300 g, 10 min, 4 °C) und das Pellet für die Zellzählung in 1 ml Färbepuffer (FP) resuspendiert.

Färbepuffer:	PBS ⁻	500 ml
	BSA	5 g
	Sodium Acid	2.5 ml

Für die Bestimmung der Zellzahl werden bei einer BAL mit LPS-Gabe 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Türks-Lösung gemischt. Bei einer BAL ohne LPS-Gabe werden 10 µl unverdünnt eingesetzt und mittels Zählkammer ausgezählt.

2.2.7 Präparation der Lunge

Die Präparation der Lunge folgt im Anschluss an die BAL. Die mediastinalen Strukturen werden en bloc entnommen und die einzelnen Lungenlappen abpräpariert. Diese werden in einer Petrischale mit einer scharfen Schere und einigen Tropfen der Enzymlösung zerkleinert und mittels Einmalpasteurpipette in die restliche Enzymlösung in ein 50-ml-Falcon übertragen.

Enzymlösung:	Collagenase XI	5 µl gelöst in PBS ⁻
	Hyaluronidase	5 µl gelöst in PBS ⁻
	DNase	5 µl gelöst in PBS ⁻
	Gr-1 ungefärbt	100 µl
	PBS ⁻	5 ml

Wird mehr als eine Lunge präpariert, werden die zerkleinerten Lungen in der Zwischenzeit bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Die Lunge wird 30 min bei 37 °C und 200 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert. Zum Durchsieben der Lunge wird ein 50-ml-Falcon mit einem Zellsieb vorbereitet. Nach der Inkubation wird das Lunge-Enzymlösungsgemisch auf das Zellsieb gegeben und mit dem Stempel einer 2-ml-Spritze durchgesiebt. Während des Durchsiebens wird mit PBS⁻ nachgespült (Endvolumen max. 20 ml). Danach wird zentrifugiert (300 g, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Lysepuffer resuspendiert.

Lysepuffer:	NH ₄ Cl (1,5 M)	10,03 g
	NaHCO ₃ (0,1 M)	1,05 g
	Na ₂ -EDTA (0,01 M)	465,00 mg
	Aqua bidest.	125,00 ml
	Mit Aqua bidest. 1:10 verdünnen.	

Nach 5 min Inkubation im Dunkeln wird die Lyse mit 20 ml FP gestoppt, die Probe zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml FP für die Zellzählung resuspendiert. Die Zellzählung erfolgt mithilfe einer Zählkammer. Dafür werden 10 µl der Probe mit 90 µl Türks-Lösung gemischt.

2.2.8 Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS)

Grundlagen

Mit der Durchflusszytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einer Zelle möglich. Zellen können so differenziert und zum Beispiel einzelnen Subgruppen zugeordnet werden. Das Durchflusszytometer erlaubt die gleichzeitige Messung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen an Einzelzellen. Die Zellen werden hierfür mit Fluorochrom-behafteten Antikörpern markiert und die Zellsuspension aus dem Probenröhrchen über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette gezogen. Als Lichtquelle für die Messung in der Küvette dient ein Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Trifft Licht auf die Zellen, wird der

Strahl in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Zellen gestreut (Herzenberg et al. 1976:108-111).

Das Durchflusszytometer unterscheidet zwischen:

- Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC), das entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen wird und ein Maß für die Größe der Zellen darstellt,
- Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), das im 90°-Winkel zum einfallenden Licht gemessen wird und von der komplexen Streuung durch intrazelluläre Kompartimente abhängt. Es erlaubt Aussagen über die intrazelluläre Granularität und Binnenstruktur. Im gleichen Winkel wird die
- Fluoreszenzintensität gemessen, bei der das Fluorochrom der markierten Zellen durch den Laser angeregt wird und die Energie in Form von Licht einer anderen, höheren Wellenlänge emittiert wird. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist abhängig vom eingesetzten Fluorochrom. Das verwendete Fluorochrom Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) beispielsweise emittiert Licht bei 525 nm, Allophycocyanin (APC) bei 660 nm, Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) bei 670 nm (Sack et al. 2007:27 ff., Fluorophores.org – Datenbank für Fluoreszenzfarbstoffe).

Pro Probe werden 10 000 Zellen am Durchflusszytometer FACSort (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Die Auswertung erfolgt mithilfe der Programme "CellQuestPro" und "Flowjo".

FACS-Färbung

Die Zellsuspensionen aus BAL und Lungenpräparation werden auf 2×10^5 Zellen/100 µl verdünnt bzw. konzentriert. Die Antikörper werden mit FP nach Tabelle 4 verdünnt und je 1 µl nach Schema (Tabelle 5) in FACS-Röhrchen vorgelegt. Je Röhrchen werden 100 µl der Zellsuspension der BAL bzw. der Lungenpräparation dazupipettiert. Für die Oberflächenfärbung werden die Proben 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben zweimal mit je 1 ml FP gewaschen, zentrifugiert (1300 rpm, 10 min, 4 °C) und letztlich in 400 µl (200 µl PFA 4 % und 200 µl FP) Fixierlösung resuspendiert. Danach erfolgt die Messung am Durchflusszytometer.

Tabelle 4: Verdünnungsschema und Spezifität der Antikörper

AK = Antikörper, FP = Färbepuffer

	AK (µl)	FP (µl)	Spezifität
7/4 FITC	1	4	7/4 Klon neutrophiler Granulozyten
CD 45 PerCP	1	9	Leukozyten
Gr-1	1	9	PMN
IgG2a FITC	1	24	Korrespondierender Isotyp
IgG2b APC	1	3	Korrespondierender Isotyp

Tabelle 5: Pipettierschema für Durchflusszytometrie

Röhrchen	Färbung je 1 µl	BAL je Probe 100 µl	Lunge je Probe 100 µl
1	Ungefärbt	X	
2	7/4 FITC	X	
3	CD45 PerCP	X	
4	Gr-1	X	
5	CD45 PerCP IgG2a FITC IgG2b APC	X	
6	7/4 FITC CD45 PerCP Gr-1 (bei Lungenprobe nicht pipettieren)	X	X

2.2.9 Evans blue

Evans blue ist ein Marker für die Permeabilität der kapillär-alveolären Membranen. Da Evans blue eine hohe Affinität zu Albumin besitzt und Albumin unter physiologischen Bedingungen die Blut-Luft-Schranke nicht durchdringen kann, zeigt die Konzentration von Evans blue das Ausmaß der Zerstörung der Blut-Luft-Schranke an.

Evans blue wird mit NaCl 0,9 % zu einer Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Die im Versuch verwendete Dosis beträgt 20 µl/kg KG und wird der Maus 30 min vor Versuchsbeginn in die Schwanzvene injiziert.

Die Maus wird narkotisiert und vor der Fellpräparation mit 70-prozentigem Alkohol eingesprüht und abgewischt. Vor dem Öffnen des Abdomens und des Thorax wird das Fell entfernt. Aus der rechten Herzkammer wird Blut mit einer vorheparinisierten Spritze entnommen und in einen Eppendorf-Cup überführt. Nach der Zentrifugation (13 000 rpm, 15 min, 4 °C) wird das Plasma abpipettiert und bis zur spektrometrischen Messung bei 4 °C aufbewahrt.

Nachdem die Vena cava infradiaphragmal durchtrennt wurde, wird das Herz durch die rechte Herzkammer mit 3 ml PBS⁻ perfundiert, um das intravaskuläre Blut aus der Lunge zu spülen. Die Lunge wird mit den mediastinalen Strukturen entnommen und die Lungenlappen separiert. Dabei werden die Hauptbronchien vom Hilum der Lunge ausgeschnitten, da diese Evans blue selektiv aufnehmen. Um die Lungenlappen zu homogenisieren, werden sie gewogen und PBS⁻ (350 µl/100 mg Lunge) hinzugefügt. Nach der Homogenisation wird die Probe mit zwei Teilen Formamid versetzt und 12–18 h bei 60 °C inkubiert. Nach der Inkubation und 30 min Zentrifugation bei 5 000 rpm werden je 200 µl des Überstandes in drei *wells* der Mikrotiterplatte pipettiert. Vom Plasma werden in einer 1:4-Verdünnung mit PBS⁻ ebenfalls drei *wells* mit je 200 µl auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Aus der angesetzten Evans-blue-Lösung wird eine Standardreihe hergestellt (Evans blue in µg/200µl: 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0) und pro Verdünnung jeweils drei *wells* mit je 200 µl befüllt. Danach erfolgt die Messung der Absorption im Spektrometer bei 620 nm und bei 740 nm. Das Absorptionsmaximum von Evans blue befindet sich bei 620 nm. Tritt keine Absorption bei 740 nm auf, weist das auf eine Kontamination der Probe mit Hämipigmenten hin. Die korrek-

te Absorption (A) von Evans blue im Plasma oder Gewebe bei 620 nm wird nach vorgelegter Gleichung kalkuliert:

$$A = \text{gemessene Absorption bei 620 nm} - (1,426 \times \text{Absorption bei 740 nm} + 0,03)$$

Zur Auswertung wird die Software Magellan verwendet.

2.2.10 Bestimmung der Zytokine (ELISA)

Grundlagen des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion, das Anfang der 1970er-Jahre von der Arbeitsgruppe um Peter Perlmann und Eva Engvall von der Universität in Stockholm, Schweden entwickelt wurde (Lequin 2005:2415). Man macht sich hierbei die Eigenschaft zunutze, dass Antigene an spezifische Antikörper binden. Das Antigen ist mit einem Enzym, z. B. alkalische Phosphatase, markiert. Dieses Enzym katalysiert bei Zugabe des entsprechenden Substrates eine Reaktion. Die stattgefundenene Reaktion ist meist als Farbumschlag sichtbar. Eine Reaktion gilt als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens (Engvall et al. 1971:429).

Double-Antibody-Sandwich ELISA

Zur Bestimmung der Zytokine im hier verwendeten Versuchsaufbau werden *Double-Antibody-Sandwich-ELISAs* verwendet. Beim Sandwich-ELISA handelt es sich um eine spezielle ELISA-Technik, die zwei Antikörper verwendet, die beide an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden. Der erste Antikörper, der sogenannte *coating*-Antikörper, wird an eine feste Phase (96-well-Mikrotiterplatte) gebunden. Danach wird das nachzuweisende Antigen zugegeben, das an den *coating*-Antikörper bindet. Nach der Inkubation wird die Platte zum Entfernen des nichtgebundenen Antigens gewaschen. Ein zweiter AK, der sogenannte *detection*-AK, wird hinzugegeben. Dieser bindet ebenfalls an das Antigen und ist zusätzlich mit einem Enzym verbunden. Das Antigen ist zwischen den Antikörpern gefangen (= Sandwich). Durch erneutes Waschen wird der überschüssige *detection*-AK entfernt. Im nächsten Schritt wird ein Substrat

zugegeben, welches vom Enzym des *detection*-AK zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt wird (Voller et al. 1978:508).

Durch den nun folgenden Farbumschlag erfolgt der visuelle Nachweis über das Vorhandensein des Antigens. Zum quantitativen Nachweis wird eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen im Spektrometer gemessen, um eine Kalibrierungskurve für die optische Extinktion zu erhalten (Voller et al. 1978:511).

Bestimmung von TNF- α , KC, IL-6, MIP-2

Aus der BAL von Mäusen werden TNF- α , KC, IL-6, MIP-2 quantitativ mit spezifischen ELISA-Tests (DuoSet ELISA Development System, R&D Systems) bestimmt. Die Durchführung erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers als *Double-Antibody-Sandwich-ELISA*. Die Proben der BAL mit LPS werden 1:8 verdünnt, die Proben der BAL ohne LPS werden unverdünnt eingesetzt.

Probenentnahme für ELISA

Das Vorgehen der Probenentnahme für ein ELISA ist identisch mit dem Vorgehen bei der BAL (vgl. Kapitel 2.2.6). Es werden exakt 2 ml BAL benötigt. Für die BAL-Entnahme wird eiskaltes PBS⁻ verwendet. Nach der Entnahme werden die Proben zentrifugiert (1 300 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand in vorgekühlte Eppendorf-Cups aliquotiert. Die Proben können bei -80 °C bis zur Durchführung des ELISAs eingefroren werden.

2.2.11 Transplantation

Isolierung muriner Knochenmarkzellen

Die Maus wird anästhesiert, folgend euthanasiert und mit 70-prozentigem Alkohol abgewaschen. Femur und Tibia der Hinterläufe werden im Hüftgelenk abgetrennt. Unter sterilen Kautelen werden die Knochen von Muskel- und umgebendem Bindegewebe befreit. Die Knochenenden werden mit einer Schere abgetrennt und die freigelegten Knochenmarkkanäle mit RPMI-Medium in eine große Petrischale gespült (10-ml-Spritze, Kanüle 25 G). Anschließend werden die Zellen durch langsames Auf- und Abziehen in einer 10-ml-Spritze vereinzelt und in ein 15-ml-Falcon überführt und gekühlt. Für die Bestimmung der Zellzahl wer-

den 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Türks-Lösung gemischt, ausgezählt und die Gesamtzellzahl berechnet ($GZZ = ZZ \times 2,5 \times 10 \times 1000 \times 10$). Mit der Gesamtzellzahl wird die gewünschte Injektionsmenge für die Transplantation von $3-5 \times 10^6$ Zellen in 300 µl eingestellt.

Bestrahlung der Mäuse

Am Tag der Transplantation werden die Empfängertiere zweimal im Abstand von vier Stunden mit einem Gammacell-Bestrahler und 6 Gy bestrahlt.

Transplantation

Nach der Bestrahlung werden dem Empfängertier die Zellen des Spendertieres i. v. injiziert. Anschließend werden die Tiere unter einer sterilen Abzugsvorrichtung in Käfige mit steriler Haube gebracht. Bis zum Versuchstag erhalten die Tiere autoklaviertes Trinkwasser und alle zwei Wochen für eine Woche zusätzlich mit dem Trinkwasser ein Antibiotikum (1mg/ml) (Cotrim E 480 mg/5 ml).

Nach sechs bis acht Wochen können die Versuche durchgeführt werden.

2.2.12 Zellen

Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgt im Brutschrank bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt und 91 % relativer Luftfeuchtigkeit. Die Zellen sind adhärent und schnell wachsend. Folgende Medien werden für die Kultivierung der Zellen eingesetzt.

A549:	F-12 Ham's	500,0 ml
	FCS Gold	50,0 ml
	1% Antibiotic-Antimycotic-Solution	5,0 ml
	I-Glutamin	2,5 ml
HMVEC-L:	EBM-2	500,0 ml
	FBS	25,0 ml
	rhFGF	2,0 ml
	VEGF	0,5 ml

Materialien und Methoden

R ³ -IGF-1	0,5 ml
Ascorbic Acid	0,5 ml
rhEGF	0,5 ml
GA-1000	0,5 ml
Hydrocortison	0,2 ml

Das Medium wird dreimal pro Woche gewechselt. Die Zellen werden zweimal pro Woche 1:3 passagiert. Dazu wird die Zellkultur der Epithelzellen erst mit 10 ml PBS⁻ gewaschen und dann mit 4 ml Accutase über 5–15 min im Brutschrank abgelöst. Die Endothelzellen werden mit 3 ml Trypsin/EDTA Solution für 5–10 min im Brutschrank abgelöst. Trypsin wird mit der doppelten Menge Trypsin Neutralizing Solution neutralisiert. Die HMVEC-L-Zellkulturflaschen werden mit Poly-L-Lysin beschichtet. Zuletzt wird je ein Drittel der Zellsuspension in die mit 15–20 ml Medium vorbereiteten Zellkulturflaschen gegeben.

Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren der Zellen werden spezielle Medien verwendet.

A 549:	DMSO	5 %
	Medium	95 %

HMVEC-L:	DMSO	10 %
	FCS	10 %
	Medium	80 %

Die Zellen werden je nach Herkunft wie für die Passage mit Accutase oder Trypsin/EDTA Solution abgelöst und in 20 ml Zellkulturmedium übertragen. Nach Zentrifugation (900 rpm, 10–15 min, 4 °C) wird das Pellet in 5 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen zu 1,5 ml aliquotiert. Die Kryoröhrchen werden zuerst bei –80 °C über vier Stunden und dann in Flüssigstickstoff gelagert.

Zum Auftauen werden die Kryoröhrchen mit aufgedrehtem Deckel zum Entlüften aus dem Stickstoff in ein Wasserbad mit 37 °C gegeben. Danach werden die Röhrchen von außen desinfiziert, geöffnet und die Zellsuspension in ca.

15 ml Medium gegeben. Die Zellsuspensionen werden 8 min mit 1 000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Pellet vorsichtig in 15 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. Im letzten Schritt wird die Zellsuspension in die Zellkulturflasche pipettiert und kann jetzt im Brutschrank kultiviert werden.

Aussaat

Die Zellen werden in der Zellkulturflasche entsprechend dem zuvor beschriebenen Passagevorgang abgelöst. Drei Milliliter der Ablöselösung werden abpipettiert, in ein 50-ml-Falcon übertragen und im Brutschrank für 15 min inkubiert. Danach werden die abgelösten Zellen mit Medium aufgefüllt und gründlich resuspendiert.

Bei der Aussaat der Endothelzellen werden 100 µl der Zellsuspension in die *inserts* (Einlagen) und 1 ml Medium in die *wells* einer Transwellplatte gegeben. Für einen Transmigrationsversuch lässt man die Zellen ungefähr eine Woche wachsen. Ein Medienwechsel erfolgt alle drei Tage.

Bei den Epithelzellen ist zu beachten, dass diese umgedreht ausgesät werden müssen, sodass die Basalmembran im Versuch oben liegt. Dazu werden die *inserts* umgedreht und vorsichtig 100 µl der Zellsuspension auf den Boden pipettiert. Die Platten werden in dieser Position 24 Stunden im Brutschrank zum Anwachsen der Zellen belassen. Dann werden die *inserts* umgedreht und 1 ml Medium in jedes *well* gegeben. Auch bei den Epithelzellen lässt man die Zellkulturen ca. eine Woche wachsen. Ein Medienwechsel erfolgt alle drei Tage.

2.2.13 Transmigrationsassay

Isolierung humaner PMNs

Freiwilligen Probanden wird ca. 20 ml venöses Vollblut langsam in Citratmonovetten entnommen. In sterilen 12-ml-Zellkultur-Röhrchen werden erst 4 ml 72-prozentiges Percoll, dann 4 ml 63-prozentiges Percoll und zuletzt 4 ml Vollblut sehr langsam übereinandergeschichtet, um eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten zu vermeiden.

Percoll 72 %: Percoll 100 % 72 ml

Materialien und Methoden

PBS 10x	8 ml
PBS 1x	20 ml

Percoll 63 %:	Percoll 100 %	63 ml
	PBS 10x	7 ml
	PBS 1x	30 ml

Damit sich die zellulären Bestandteile des Blutes der Größe nach anordnen, werden die Proben 30 min mit 1 700 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Im Pellet finden sich die Erythrozyten, zwischen den Percoll-Phasen die neutrophilen Granulozyten und zwischen Percoll und Serum bilden Lymphozyten und Monozyten eine Bande. Das Serum und die erste Percoll-Phase werden mit einer Glaspipette vorsichtig abgesaugt. Die Bande mit neutrophilen Granulozyten wird mit einer Glaspipette abgenommen und in ein 50-ml-Falcon überführt. Der Falcon wird mit eiskalter Lyse aufgefüllt und die Erythrozyten je nach Anzahl für 10–15 min lysiert.

Lyse:	NH ₄ CL	4,0 g
	NaHCO ₃	420,0 mg
	EDTA	18,5 mg
	Aqua dest.	500,0 ml

Nach der Lyse wird die Probe nochmals zentrifugiert (1 100 rpm, 10 min, 4 °C) und die PMN-Pellets in 5 ml HBSS⁻ gepoolt. Von dieser Zellsuspension werden 10 µl mit 90 µl Türks-Lösung vermischt, ausgezählt und die Gesamtzellzahl berechnet ($GZZ = ZZ \times 2,5 \times 10 \times 1\,000 \times 5$). Der Falcon wird mit HBSS⁻ aufgefüllt und die Zellen gewaschen (1 100 rpm, 10 min, 4 °C). Danach wird die Zellzahl auf 10×10^6 pro ml mit 37 °C warmem HBSS⁺ eingestellt.

Vorbehandlung der PMNs, des Lungenepithels und des Endothels

Bei den In-vitro-Transmigrationsversuchen werden drei verschiedene Bedingungen betrachtet:

1. Nur PMNs werden mit Antagonist bzw. Agonist behandelt.
2. Nur Epithel bzw. Endothel werden mit Antagonist bzw. Agonist behandelt.

3. Sowohl PMNs als auch Epithel bzw. Endothel werden mit Antagonist bzw. Agonist behandelt.

Die Zellen werden jeweils mit verschiedenen Konzentrationen des Antagonisten oder Agonisten behandelt: 10 ng/ml, 1 ng/ml und 0,1 ng/ml; die jeweilige Konzentration wird mit HBSS⁺ eingestellt. Der A_{2B}-Agonist (BAY 60-6583) sowie der Antagonist (PSB 1115) sind in DMSO gelöst. Zur Behandlung der PMNs mit den Agonist-/Antagonistlösungen werden je 500 µl der zuvor eingestellten PMN-Zellsuspension in drei Eppendorf-Cups (1,5 ml) pipettiert und abzentrifugiert (1 100 rpm, 6 min, RT). Das Pellet wird in 1 ml der Lösung, die zur Behandlung dient, resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen abzentrifugiert und in der Ausgangsmenge (500 µl) in HBSS⁺ resuspendiert. Für die Behandlung des Lungenepithels bzw. -endothels werden je zwei Transwellplatten aus dem Zellkulturschrank genommen. Das Medium wird vorsichtig aus den *wells* abpipettiert und die entsprechende Behandlungslösung dazupipettiert. Die Lösung wird 30 min bei 37 °C inkubiert.

Migrationsassay

In die Transwellplatten (24 *wells*) werden nach Schema (Abbildung 5) je 900 µl HBSS⁺ oder MIP-2 (200 ng/ml) pipettiert. MIP-2 dient als chemotaktischer Reiz für die PMNs (vgl. Kapitel 1.4). Die *inserts* werden aus den inneren *wells* herausgenommen und vorsichtig mit 37 °C warmem HBSS⁺ gewaschen. Danach werden die *inserts* in die äußeren *wells* gelegt und jeweils 100 µl der PMN-Zellsuspension auf die *inserts* pipettiert. Für die Migration wird die Transwellplatte eine Stunde bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Die *inserts* werden aus den äußeren *wells* herausgenommen. Um die Zellen zu vereinzeln, werden je 50 µl Citrat und Triton X 10x in jedes äußere *well* pipettiert.

Danach wird die Transwellplatte mit Parafilm überzogen und die Zellen mit Ultraschall lysiert. Aus jedem äußeren *well* werden Triplikate à 50 µl, aus der Standardreihe Duplikate à 50 µl auf eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Erstellung der Standardreihe (elf Proben) wird die erste Standardprobe aus 850 µl HBSS⁺ + 50 µl PMNs + 50 µl Citrat + 50 µl Triton X 10x hergestellt und ebenfalls mit Ultraschall lysiert.

well (außen)	HBSS ⁺	HBSS ⁺	MIP-2	MIP-2	MIP-2	MIP-2
insert	HBSS ⁺	PMN	PMN	PMN ₁₀	PMN ₁	PMN _{0,1}
insert	HBSS ⁺	PMN	PMN	PMN ₁₀	PMN ₁	PMN _{0,1}
well (außen)	HBSS ⁺	HBSS ⁺	MIP-2	MIP-2	MIP-2	MIP-2

Abbildung 5: Pipettierschema der 24-well-Platte für den Transmigrationsversuch

Für die weitere Standardreihe werden je 500 µl HBSS⁺ in die Röhrchen der Standardproben 2–11 vorgelegt. Im nächsten Schritt werden aus Standard eins 500 µl in Standard zwei, von Standard zwei 500 µl in Standard drei usw. pipetiert. In Standard elf wird nur das HBSS⁺ belassen.

Für die Messung am Photometer werden 75 µl der ABTS-Entwicklungsreagenz in jedes *well* gegeben.

ABTS-Entwicklungsreagenz:

ABTS	28 mg
Citrat	5 ml
Aqua dest.	45 ml
H ₂ O ₂	50 µl

Die Proben werden sofort bei 405 nm im Photometer gemessen.

2.2.14 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde Graph Pad Prism 5.0 verwendet. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Es wurde mit One-way-Anova und folgend Turkeys post Test sowie unpaired t-test ausgewertet. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Real-time-RT-PCR

Um die Transkription von $A_{2B}AR$ nach einem inflammatorischen Stimulus zu untersuchen, wurde eine Real-time-RT-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS-Gabe durchgeführt. Die Transkription von $A_{2B}AR$ nimmt nach 2–3 h deutlich zu (Abbildung 6). Um den weiteren Verlauf der A_{2B} -mRNA zu zeigen, wurden einmalig Transkriptionslevel nach 6, 12 und 24 h analysiert. Hier ist ein erwarteter Rückgang erkennbar (Zeitpunkt 0: $1,0 \pm 0,0$; 1 h: $0,49 \pm 0,11$; 2 h: $1,61 \pm 0,07$; 3 h: $1,50 \pm 0,13$).

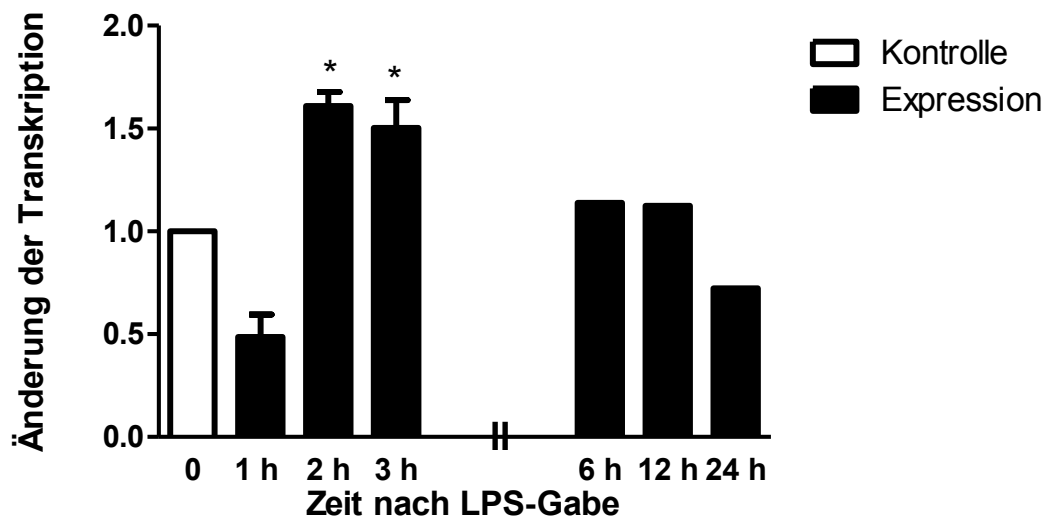


Abbildung 6: Veränderung in der Transkription von $A_{2B}AR$. Änderung der Transkription von $A_{2B}AR$ nach 1 h, 2 h und 3 h (schwarze Balken) nach LPS-Gabe gegenüber der Kontrolle ohne LPS-Gabe (nicht gefüllter Balken). Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung nach 2–3 h gegenüber der Kontrolle. * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 4$). Die schwarzen Balken für 6 h, 12 h, 24 h nach LPS-Gabe zeigen den weiteren zeitlichen Transkriptionsverlauf (einmalige Messung ohne Standardabweichung).

3.2 Differentialblutbild

Die absoluten Zellzahlen der Immunzellen wurden sowohl in den Knock-out- als auch in den Wildtypmäusen mittels Differentialblutbild ermittelt. In Tabelle 6 sind die absoluten Zellzahlen der Leukozyten sowie die Differenzierung in PMNs, Lymphozyten und Monozyten dargestellt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mäusestämmen.

Tabelle 6: Differentialblutbild. Differentialblutbild aus dem peripheren Blut von $A_{2B}AR^{-/-}$ -Mäusen und deren Wildtypform. Es wurden jeweils 10^3 Zellen/ μ l ausgezählt. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 6).

	C₅₇Bl6	A_{2B}AR^{-/-}	
	Absolute Zellzahl (x 10 ⁶)	Absolute Zellzahl (x 10 ⁶)	p
Leukozyten	9,4 \pm 0,7	10,0 \pm 3,9	0,87
PMN	1,2 \pm 0,4	1,6 \pm 0,8	0,26
Lymphozyten	7,7 \pm 0,5	7,6 \pm 3,1	0,93
Monozyten	0,1 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0	0,08

3.3 Histologische und immunhistochemische Untersuchung

Mit einer histologischen und immunhistochemischen Untersuchung der Mäuselungen von C₅₇Bl/6- und A_{2B}AR^{-/-}-Mäusen soll untersucht werden, ob der A_{2B}AR bei der Migration neutrophiler Granulozyten eine Rolle spielt. Um eine Entzündungsreaktion der Lunge auszulösen, haben die Mäuse LPS inhaliert.

Die histologischen Schnitte in Hämatoxylin/Eosin-Färbung in Abbildung 7 zeigen eine Mehranreicherung von neutrophilen Granulozyten im Interstitium nach LPS-Inhalation. Allerdings ist zwischen den Schnitten von A_{2B}AR^{-/-}-Mäusen und Wildtypmäusen kein eindeutiger Unterschied erkennbar.

Ergebnisse

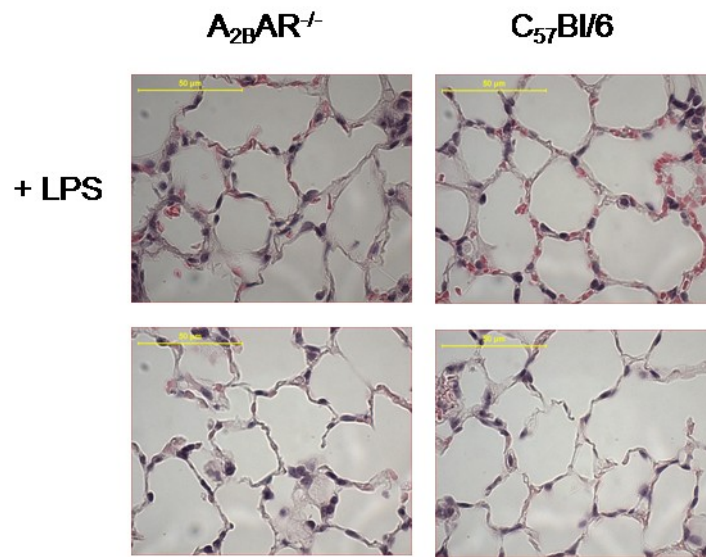


Abbildung 7: Lungenhistologie in HE-Färbung. Infiltration der Lunge durch neutrophile Granulozyten. $A_{2B}AR^{-/-}$ -Mäuse und ihre korrespondierenden Wildtypkontrollen wurden LPS ausgesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Lungen entnommen, fixiert und gefärbt (n = 3).

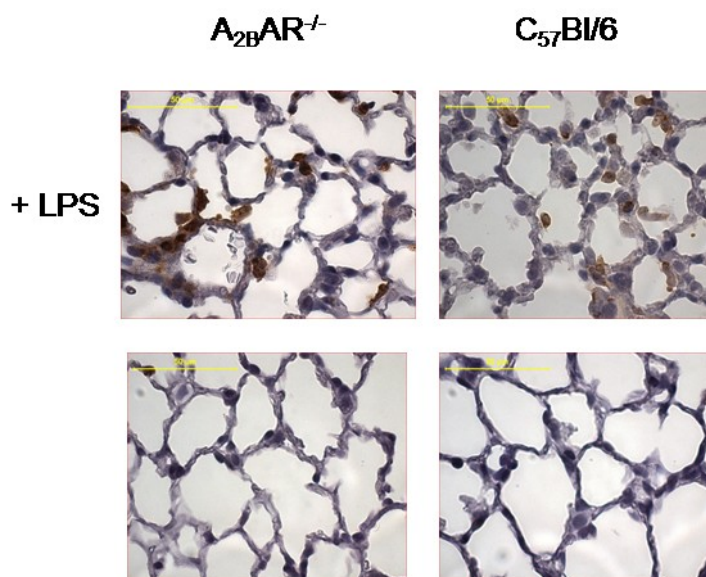


Abbildung 8: Lungenhistologie mit Immunhistochemie. Infiltration des Lungengewebes mit neutrophilen Granulozyten. $A_{2B}AR^{-/-}$ -Mäuse und ihre korrespondierenden Wildtypkontrollen wurden LPS ausgesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Lungen entnommen, fixiert und mit einem speziellen Marker für Neutrophile (7/4; braune Zellen) gefärbt (n = 3).

In den Bildern der Immunhistochemie (Abbildung 8) ist eine deutliche Mehransammlung neutrophiler Granulozyten nach LPS-Gabe erkennbar. In den Schnitten von $A_{2B}AR^{-/-}$ ist dies deutlicher zu sehen als in den Schnitten der Wildtypkontrollen. Die Zellen wurden mit einem speziellen Marker für Neutrophile markiert und erscheinen daher auf den Bildern der Immunhistochemie braun.

3.4 Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten in vivo

Im Folgenden wurde die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten in die unterschiedlichen Lungenkompartimente in einem akuten inflammatorischen Prozess analysiert. Mit dem Migrationsversuch wird die Neutrophilenverteilung im vaskulären, interstitiellen und alveolären Raum untersucht.

Abbildung 9 zeigt, dass sich die Anzahl der PMNs in den Gefäßen (A, IV) nach LPS-Gabe nicht wesentlich von der der Kontrollgruppen ohne LPS-Gabe unterscheidet. Auch zwischen $A_{2B}AR^{-/-}$ - und $C_{57}Bl/6$ -Mäusen ließ sich bei gleicher Behandlung kein signifikanter Unterschied feststellen ((A) $C_{57}Bl/6$: $0,33 \pm 0,16$; $C_{57}Bl/6$ + LPS: $0,82 \pm 0,41$; $A_{2B}AR^{-/-}$: $0,68 \pm 0,62$; $A_{2B}AR^{-/-}$ + LPS: $1,02 \pm 0,75$).

Im Interstitium (Abb. 9, B, IS) lässt sich eine signifikant höhere Anzahl an PMNs nach LPS-Gabe in $A_{2B}AR^{-/-}$ - und $C_{57}Bl/6$ -Mäusen im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen beobachten. Zudem zeigt sich eine signifikant höhere Anzahl von PMNs nach LPS-Gabe in den Knock-out- als in den Wildtypmäusen ((B) $C_{57}Bl/6$: $0,10 \pm 0,04$; $C_{57}Bl/6$ + LPS: $2,94 \pm 0,56$; $A_{2B}AR^{-/-}$: $0,30 \pm 0,18$; $A_{2B}AR^{-/-}$ + LPS: $4,66 \pm 0,64$).

In der bronchoalveolären Lavage (Abb. 9, C, BAL) erkennt man, dass sich hier nach LPS-Gabe bei beiden Mäusestämmen eine höhere Anzahl neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu den Kontrollgruppen befindet, wobei sich zwischen Knock-out- und Wildtypmäusen keine signifikanten Unterschiede nachweisen lassen ((C) $C_{57}Bl/6$: $0,0 \pm 0,0$; $C_{57}Bl/6$ + LPS: $1,80 \pm 0,50$; $A_{2B}AR^{-/-}$: $0,0 \pm 0,0$; $A_{2B}AR^{-/-}$ + LPS: $2,28 \pm 0,60$).

Ergebnisse

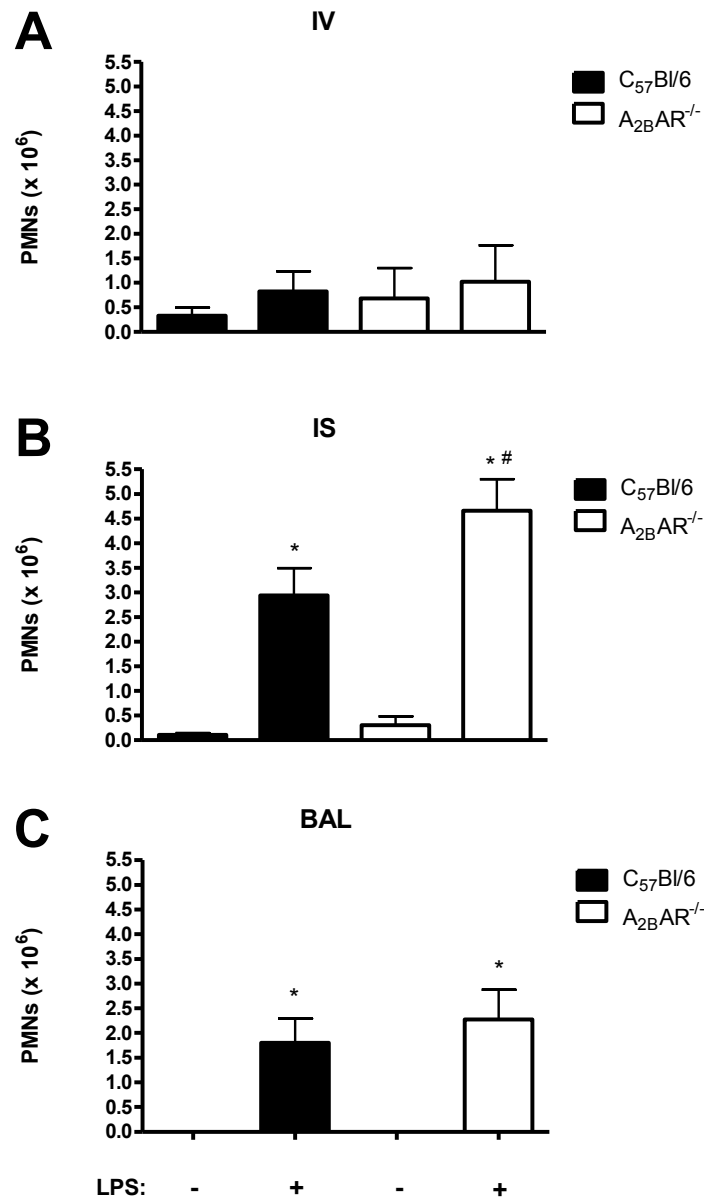


Abbildung 9: Migration neutrophiler Granulozyten. Anreicherung der neutrophilen Granulozyten in den unterschiedlichen Lungenkompartimenten von A_{2B}AR^{-/-}-Mäusen (nicht gefüllte Balken) und Wildtypmäusen (schwarze Balken). A: Ansammlung der PMNs in den Lungengefäßen (IV), B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS), C: Ansammlung der PMNs im Alveolarraum (BAL) 24 Stunden, nachdem die Tiere LPS ausgesetzt waren. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 8). * p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation. # p < 0,05 gegenüber der Wildtypkontrolle mit gleicher Behandlung.

Ergebnisse

Für eine genauere Beobachtung des zeitlichen Ablaufs der Migration wurden die drei Lungenkompartimente zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach LPS-Gabe untersucht. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse.

Im vaskulären Kompartiment (Abb. 10, A, IV) ist zu erkennen, dass sich neutrophile Granulozyten der $A_{2B}AR^{-/-}$ -Mäuse sechs bis zwölf Stunden nach LPS-Gabe im Vergleich zu den Wildtypmäusen vermehrt in den Gefäßen der Lunge anreichern ((A) $C_{57}Bl/6$: Zeitpunkt Null: $0,24 \pm 0,05$; nach 3 h: $2,31 \pm 1,11$; nach 6 h: $0,58 \pm 0,20$; nach 12 h: $0,88 \pm 0,28$; nach 24 h: $0,76 \pm 0,55$; nach 48 h: $0,04 \pm 0,07$. $A_{2B}AR^{-/-}$: Zeitpunkt Null: $0,47 \pm 0,16$; nach 3 h: $2,52 \pm 0,69$; nach 6 h: $1,28 \pm 0,21$; nach 12 h: $1,34 \pm 0,22$; nach 24 h: $1,50 \pm 0,81$; nach 48 h: $0,26 \pm 0,08$).

Im Interstitium (Abb. 10, B, IS) steigt die Anzahl der PMNs beider Mäusestämme gleichmäßig nach LPS-Gabe an, wobei im Vergleich zu den Wildtypmäusen vermehrt PMNs der $A_{2B}AR^{-/-}$ -Mäuse ins Interstitium einwandern. Nach 48 Stunden ist dies sowohl in den Knock-out- als auch in den Wildtyptieren rückläufig. Bei den Wildtypmäusen fällt im Vergleich zu den $A_{2B}AR^{-/-}$ -Mäusen auf, dass die Anzahl der interstitiellen PMNs nach 48 Stunden fast komplett auf das Normalmaß zurückgegangen ist. ((B) $C_{57}Bl/6$: Zeitpunkt Null: $0,13 \pm 0,03$; nach 3 h: $2,46 \pm 0,96$; nach 6 h: $2,58 \pm 1,01$; nach 12 h: $2,98 \pm 0,50$; nach 24 h: $3,32 \pm 0,51$; nach 48 h: $0,19 \pm 0,20$. $A_{2B}AR^{-/-}$: Zeitpunkt Null: $0,24 \pm 0,10$; nach 3 h: $1,49 \pm 0,45$; nach 6 h: $2,57 \pm 0,68$; nach 12 h: $3,11 \pm 0,55$; nach 24 h: $4,74 \pm 0,86$; nach 48 h: $1,96 \pm 0,47$.)

In der bronchoalveolären Lavage (Abb. 10, C, BAL) steigt die Anzahl der PMNs bei beiden Stämmen gleichmäßig im betrachteten Zeitraum an. Hier lässt sich kein Unterschied im Migrationsverhalten festmachen. Nach 24 Stunden sinkt die Anzahl der PMNs in der BAL wieder. Dies geschieht in den Wildtyptieren etwas schneller, sodass nach 48 Stunden in der BAL der $A_{2B}AR^{-/-}$ -Mäuse mehr PMNs zu finden sind als in der BAL der Wildtypkontrollen ((C) $C_{57}Bl/6$: Zeitpunkt Null: $0,0 \pm 0,0$; nach 3 h: $0,48 \pm 0,18$; nach 6 h: $1,08 \pm 0,33$; nach 12 h: $1,51 \pm 0,18$; nach 24 h: $2,22 \pm 0,25$; nach 48 h: $0,12 \pm 0,03$. $A_{2B}AR^{-/-}$: Zeitpunkt Null: $0,0 \pm 0,0$; nach 3 h: $0,05 \pm 0,05$; nach 6 h: $1,06 \pm 0,34$; nach 12 h: $1,35 \pm 0,11$; nach 24 h: $2,73 \pm 0,46$; nach 48 h: $0,29 \pm 0,11$).

Ergebnisse

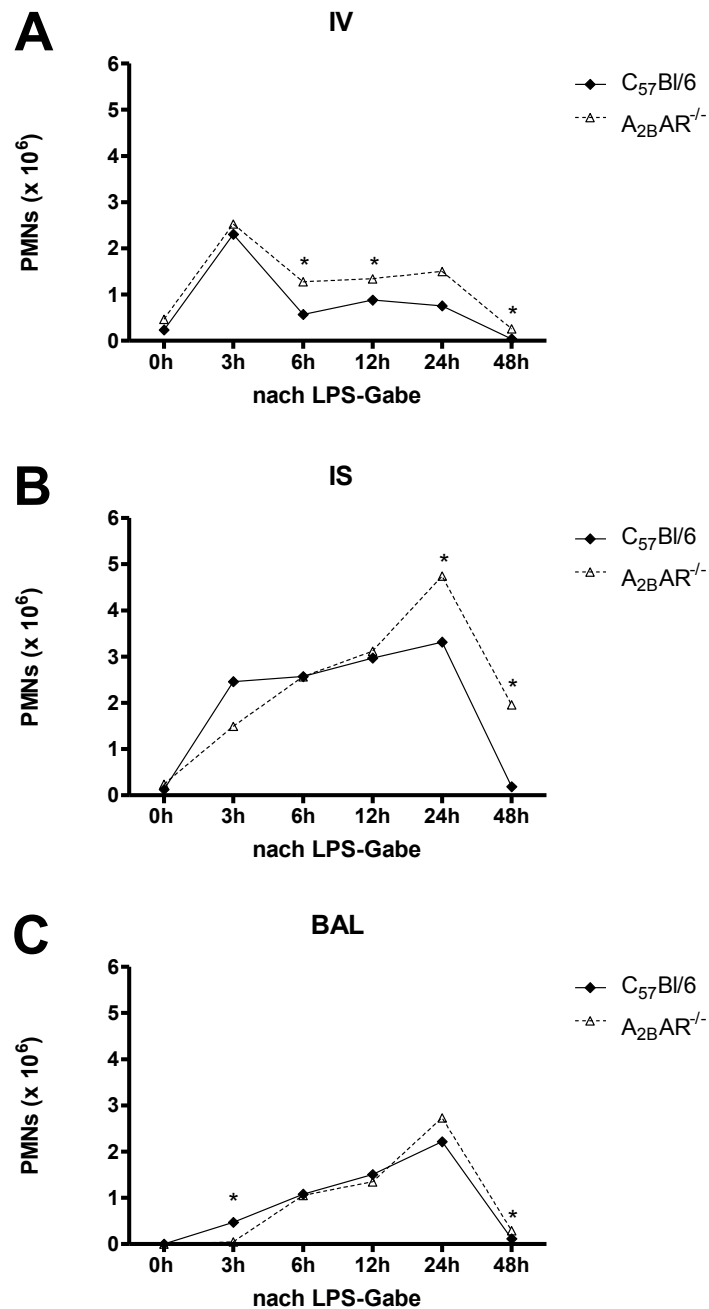


Abbildung 10: Zeitverlauf der Migration von PMNs in die Lunge. Anreicherung neutrophiler Granulozyten in den Lungenkompartimenten von C₅₇Bl/6 (durchgehende Linie) und A_{2B}AR^{-/-} (gestrichelte Linie) zu den Zeitpunkten Null, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach LPS-Gabe. A: Ansammlung von PMNs in den Lungengefäßen (IV). B: Ansammlung der PMNs im Interstitium (IS). C: Ansammlung der PMNs im alveolären Raum (BAL). Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 4). * p < 0,05 A_{2B}AR^{-/-} gegenüber dem Wildtyp.

Ergebnisse

Aus den bisherigen Ergebnissen ist ersichtlich, dass ein Fehlen von A_{2B}AR zu einer vermehrten Anreicherung neutrophiler Granulozyten im Lungeninterstitium führt. Um weiter differenzieren zu können, ob dieser Effekt von A_{2B}AR auf Blutzellen oder durch A_{2B}AR auf Gewebezellen vermittelt wird, wurde der Migrationsversuch mit chimären Mäusen durchgeführt. Hierbei wurde Knock-out-Tieren Knochenmark einer Wildtypmaus injiziert, sodass Blutzellen den Rezeptor tragen, Gewebezellen ihn aber nicht exprimieren konnten. Ebenso wurde Wildtypmäusen Knochenmark einer Knock-out-Maus injiziert, worauf die Tiere den A_{2B}AR auf Gewebezellen exprimierten, aber nicht auf Blutzellen. So konnte untersucht werden, ob es einen Unterschied in der Funktionalität von A_{2B}AR auf Blutzellen und auf Gewebezellen gibt. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis.

Im vaskulären Raum (Abb. 11, A, IV) gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mäusestämmen; auch die LPS-Gabe verändert das Ergebnis nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. ((A) C₅₇Bl/6: $0,43 \pm 0,19$; C₅₇Bl/6 + LPS: $0,70 \pm 0,13$; A_{2B}AR^{-/-}: $1,35 \pm 0,98$; A_{2B}AR^{-/-} + LPS: $0,54 \pm 0,17$; C₅₇Bl/6 auf A_{2B}AR^{-/-} + LPS: $0,70 \pm 0,30$; A_{2B}AR^{-/-} auf C₅₇Bl/6 + LPS: $1,18 \pm 0,34$).

Im Interstitium (Abb. 11, B, IS) erfolgt eine vermehrte Einwanderung der neutrophilen Granulozyten nach LPS-Gabe sowohl bei C₅₇Bl/6- als auch bei A_{2B}AR^{-/-}-Mäusen. Bei den chimären Mäusen verhalten sich die PMNs unterschiedlich. In den A_{2B}AR^{-/-}-Mäusen, die Knochenmark einer Wildtypmaus erhalten haben, hat A_{2B}AR auf Blutzellen einen protektiven Effekt, da weniger PMNs ins Interstitium einwandern. In den Wildtypmäusen, die Knochenmark von einer Knock-out-Maus erhalten haben, ist dieser Effekt dagegen nicht sichtbar. ((B) C₅₇Bl/6: $0,07 \pm 0,02$; C₅₇Bl/6 + LPS: $2,24 \pm 0,79$; A_{2B}AR^{-/-}: $0,15 \pm 0,01$; A_{2B}AR^{-/-} + LPS: $4,58 \pm 0,43$; C₅₇Bl/6 auf A_{2B}AR^{-/-} + LPS: $2,24 \pm 0,19$; A_{2B}AR^{-/-} auf C₅₇Bl/6 + LPS: $4,97 \pm 0,51$.)

Ein ähnliches Bild zeigt sich im Alveolarraum (Abb. 11, C, BAL). Sowohl C₅₇Bl/6- als auch A_{2B}AR^{-/-}-Mäuse reagieren nach LPS-Gabe mit einem signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage gegenüber ihren jeweiligen Kontrollen ohne LPS (vgl. Abb. 9, C, BAL).

Ergebnisse

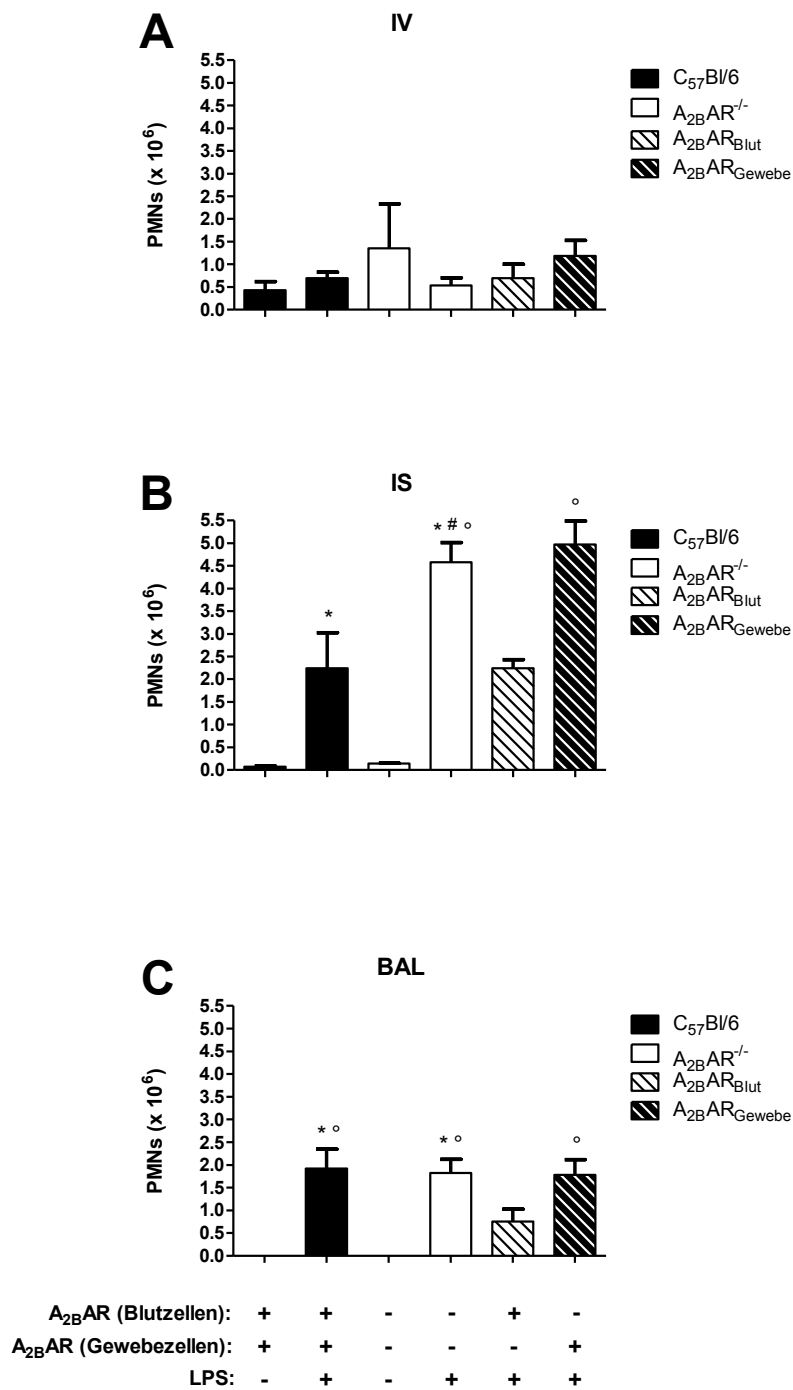


Abbildung 11: Migration neutrophiler Granulozyten in chimären Mäusen. Ansammlung der PMNs in den Lungenkompartimenten von A_{2B}AR^{-/-}- (nicht gefüllte Balken), C₅₇Bl/6- (schwarze Balken) und chimären Mäusen (schraffierte Balken). Ansammlung von PMNs in den pulmonalen Gefäßen (A, IV), im Interstitium (B, IS), im Alveolarraum (C, BAL). Die Daten sind Mittelwerte ± Stan-

Ergebnisse

dardabweichung (n = 4). * p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS-Behandlung, # p < 0,05 gegenüber der Wildtypkontrolle mit gleicher Behandlung, ° p < 0,05 gegenüber chimären Mäusen mit A_{2B}AR auf Blutzellen mit gleicher Behandlung.

Bei den chimären Mäusen lässt sich auch hier bei gleicher Behandlung ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der PMNs in der bronchoalveolären Lavage feststellen. Wie im Interstitium (Abb. 11, B, IS) hat A_{2B}AR auf Blutzellen einen protektiven Effekt. In der BAL der A_{2B}AR^{-/-}-Mäuse, die Knochenmark vom Wildtyp erhalten haben, sind signifikant weniger Zellen als in der BAL der Knock-out-Mäuse oder der Wildtypmäuse, die Knochenmark von A_{2B}AR^{-/-}-Mäusen erhalten haben. ((C) C₅₇Bl/6: 0,0 ± 0,0; C₅₇Bl/6 + LPS: 1,92 ± 0,42; A_{2B}AR^{-/-}: 0,0 ± 0,0; A_{2B}AR^{-/-} + LPS: 1,82 ± 0,30; C₅₇Bl/6 auf A_{2B}AR^{-/-} + LPS: 0,76 ± 0,27; A_{2B}AR^{-/-} auf C₅₇Bl/6 + LPS: 1,79 ± 0,33.)

3.5 Evans blue: Einfluss von A_{2B}AR auf die Permeabilität der kapillär-alveolären Membranen

Die Barrierefunktion wird mithilfe des Albuminmarkers Evans blue wie unter 2.2.9 beschrieben gemessen. In Abbildung 12 ist das Ergebnis grafisch dargestellt. Die Menge an Evans blue steigt nach LPS-Gabe in beiden Gruppen an. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Knock-out-Mäuse und ihrer Wildtyp-Kontrollgruppe nach LPS-Gabe. Dementsprechend ist die Permeabilität in den Knock-out-Tieren im Vergleich zur Wildtypkontrolle nach LPS-Gabe erhöht. Ein Unterschied zwischen den Knock-out-Tieren und den Wildtypmäusen ohne LPS-Gabe besteht nicht (C₅₇Bl/6: 118,7 ± 35,7; C₅₇Bl/6 + LPS: 224,4 ± 42,9; A_{2B}AR^{-/-}: 169,1 ± 79,3; A_{2B}AR^{-/-} + LPS: 315,6 ± 79,2).

Ergebnisse

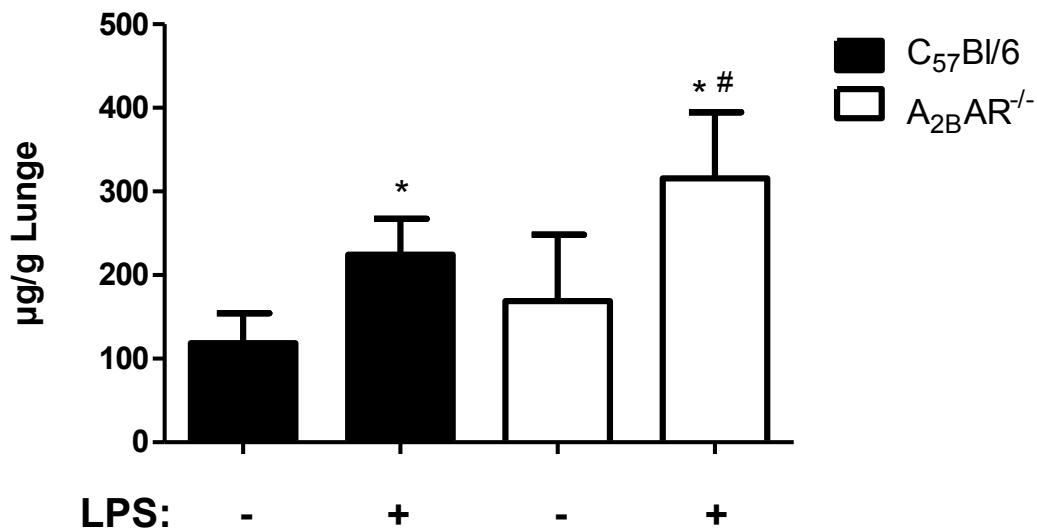


Abbildung 12: Einfluss von A_{2B}AR auf die Permeabilität. Die Inhalation von LPS führt zu vermehrter Permeabilität der alveolär-kapillären Membranen. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung von je n = 6–9 Experimenten. Die durch LPS hervorgerufene Permeabilitätssteigerung ist in C₅₇Bl/6 und A_{2B}AR^{-/-} signifikant höher als in den jeweiligen Kontrollgruppen ohne LPS.

* p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. In A_{2B}AR^{-/-} ist die Permeabilitätssteigerung nach LPS signifikant höher als in der Wildtypkontrollgruppe.

p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse von Evans-blue-Versuchen an chimären Mäusen. Die Permeabilität nach LPS-Gabe ist in den Knock-out- und Wildtyp-tieren signifikant höher als in den Kontrollgruppen ohne LPS. Zudem ist die Permeabilitätssteigerung in den Knock-out-Mäusen signifikant höher als in der Wildtypkontrolle. In den chimären Mäusen ist keine Permeabilitätssteigerung zu erkennen. Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen der chimären Mäuse besteht nicht. Die Permeabilität ist in den Mäusen, die A_{2B}AR auf Blutzellen exprimieren, signifikant niedriger als in den Knock-out-Mäusen. Bei den Mäusen, die den Rezeptor auf Gewebezellen tragen, ist die Permeabilität ebenfalls niedriger als bei den Knock-out-Mäusen. Hier ist der Unterschied aber nicht signifi-

Ergebnisse

kant. (C₅₇Bl/6: 118,7 ± 35,7; C₅₇Bl/6 + LPS: 224,4 ± 42,9; A_{2B}AR^{-/-}: 169,1 ± 79,3; A_{2B}AR^{-/-} + LPS: 315,6 ± 79,2; C₅₇Bl/6 auf A_{2B}AR^{-/-} + LPS: 191,0 ± 6,8; A_{2B}AR^{-/-} auf C₅₇Bl/6 + LPS: 215,5 ± 52,7)

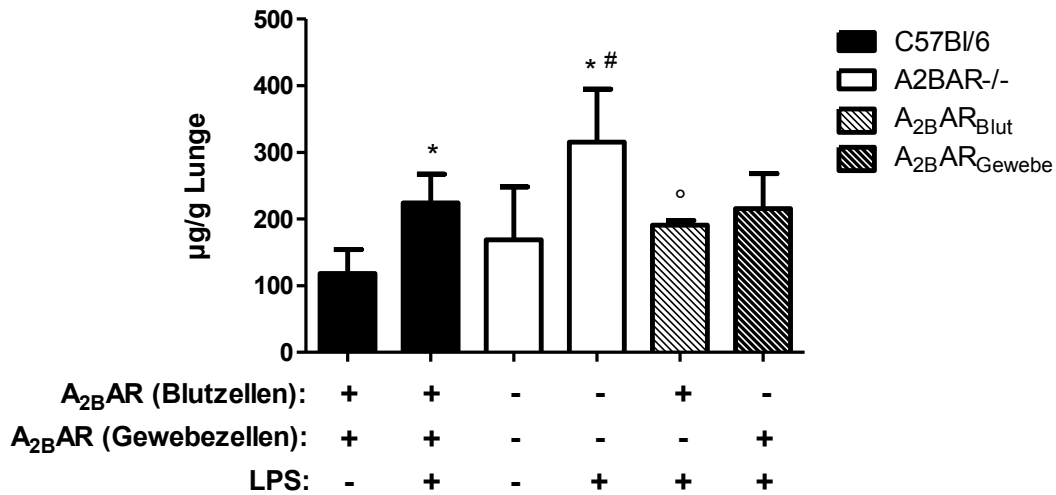


Abbildung 13: Einfluss von A_{2B}AR auf die Permeabilität in chimären Mäusen. Die Inhalation von LPS führt zu einer gesteigerten Permeabilität. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 4–9). Die durch LPS hervorgerufene Permeabilitätssteigerung ist in C₅₇Bl/6 und A_{2B}AR^{-/-} signifikant höher als in den jeweiligen Kontrollgruppen ohne LPS. * p < 0,05 gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe ohne LPS. Die Permeabilitätssteigerung ist in A_{2B}AR^{-/-} nach LPS-Gabe signifikant höher als in C₅₇Bl/6. # p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS. In den Gruppen der chimären Tiere kommt es zu keiner Permeabilitätssteigerung. Die Permeabilität ist in den Mäusen, die A_{2B}AR auf Blutzellen tragen, im Vergleich zu A_{2B}AR^{-/-} nach LPS-Gabe signifikant niedriger. ° p < 0,05 gegenüber A_{2B}AR^{-/-}.

3.6 ELISA: Einfluss von A_{2B}AR auf Zytokinausschüttung

Zur Messung der Zytokinkonzentration wurden BAL-Proben von Wildtyp- und Knock-out-Tieren entnommen, die zuvor LPS inhaliert hatten. Es wurden ebenso Proben von der jeweiligen Kontrollgruppe ohne LPS-Gabe entnommen. Die

Ergebnisse

Bestimmung der Zytokinkonzentrationen erfolgte mittels ELISA. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 14 zusammengefasst. Die Produktion aller Zytokine wird durch LPS in beiden Mäusetypen verstärkt. Zwischen $A_{2B}AR^{-/-}$ -Mäusen und der Wildtypgruppe lässt sich bei keinem der untersuchten Zytokine ein signifikanter Unterschied feststellen. (CXCL 1: $C_{57}Bl/6$: $10,3 \pm 15,5$; $A_{2B}AR^{-/-}$: $8,2 \pm 7,5$; $C_{57}Bl/6$ + LPS: $3012,0 \pm 1424,0$; $A_{2B}AR^{-/-}$ + LPS: $2398,0 \pm 513,4$. CXCL 2/3: $C_{57}Bl/6$: $16,3 \pm 10,4$; $A_{2B}AR^{-/-}$: $31,7 \pm 24,8$; $C_{57}Bl/6$ + LPS: $1772,0 \pm 891,0$; $A_{2B}AR^{-/-}$ + LPS: $2242,0 \pm 1023,0$. IL-6: $C_{57}Bl/6$: $4,9 \pm 4,9$; $A_{2B}AR^{-/-}$: $9,5 \pm 9,3$; $C_{57}Bl/6$ + LPS: $531,2 \pm 96,0$; $A_{2B}AR^{-/-}$ + LPS: $516,9 \pm 146,2$. TNF- α : $C_{57}Bl/6$: $3,7 \pm 3,6$; $A_{2B}AR^{-/-}$: $6,6 \pm 10,2$; $C_{57}Bl/6$ + LPS: $941,3 \pm 383,9$; $A_{2B}AR^{-/-}$ + LPS: $900,4 \pm 250,4$).

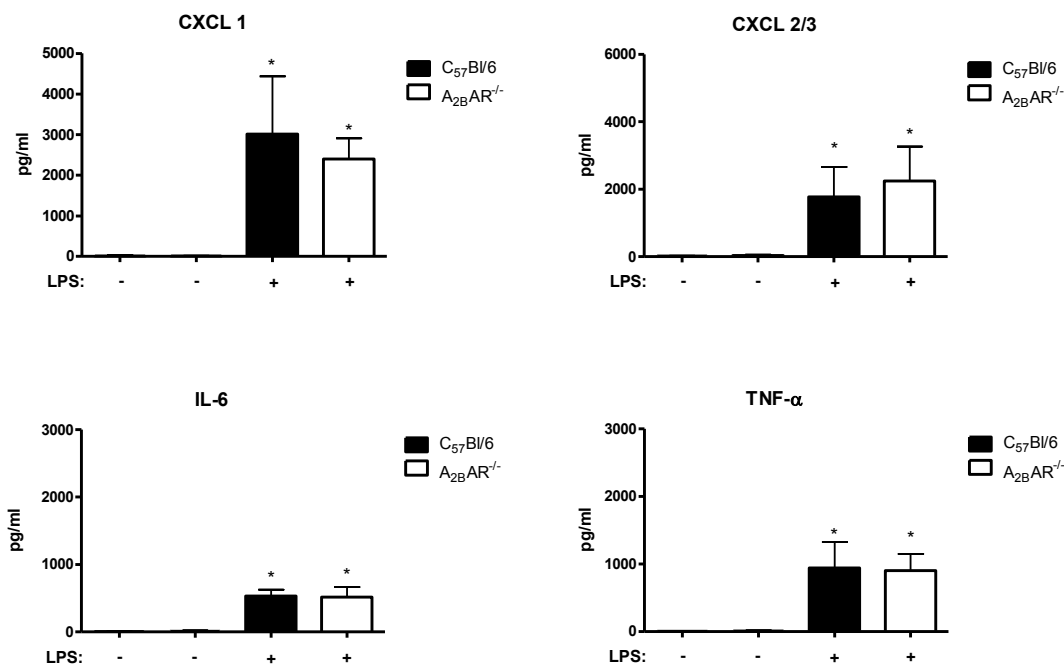


Abbildung 14: LPS-induzierte Zytokinproduktion. Konzentrationen der Zytokine IL-6, TNF- α und der murinen Chemokine CXCL 1 und CXCL 2/3 (funktionelle Analoga des humanen IL-8) in der bronchoalveolären Lavage von $A_{2B}AR^{-/-}$ -Mäusen (nicht gefüllte Balken) und ihren Wildtypkontrollen (schwarze Balken) 3 h nach LPS-Gabe und in Kontrollgruppen ohne LPS-Gabe. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (CXCL 1: $n = 16$; CXCL 2/3: $n = 20-30$; IL-6:

n = 12; TNF- α : n = 12). Die Konzentration steigt nach LPS-Gabe signifikant an.
* p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS.

3.7 Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten und Permeabilität der alveolär-kapillären Membranen bei vorheriger Behandlung mit A_{2B}AR-Agonist und -Antagonist

Das Migrationsverhalten der PMNs wurde unter dem Einfluss der Stimulation bzw. Inhibierung von A_{2B}AR untersucht. Die Wildtypmäuse wurden mit dem Agonisten (BAY 60-6583) – sowohl mit einer Dosierung von 1 mg als auch mit 2 mg/kg Körpergewicht – bzw. dem Antagonisten (PSB 1115) wie unter 2.2.5 beschrieben vorbehandelt. Dargestellt sind die Ergebnisse nach Behandlung mit 2 mg Agonist pro kg Körpergewicht.

Eine Tendenz war schon nach der Gabe von 1 mg Agonist pro kg Körpergewicht zu erkennen. Durch die Behandlung mit dem Agonisten sind in allen drei Kompartimenten in der Tendenz weniger PMNs zu finden (Abbildung 15). In der bronchoalveolären Lavage (Abb. 15, C, BAL) sind die Unterschiede zwischen der Gruppe der Wildtypiere mit vorhergehender Agonistbehandlung und der Kontrollgruppe ohne vorherige Behandlung nicht signifikant. In den Gefäßen der Lunge (Abb. 15, A, IV) und im Interstitium (Abb. 15, B, IS) ist dieser Effekt signifikant ((A) C₅₇Bl/6 ohne LPS: 0,36 ± 0,19; C₅₇Bl/6 + LPS: 1,18 ± 0,91; C₅₇Bl/6 + BAY 60-6583: 0,23 ± 0,12; C₅₇Bl/6 + PSB 1115: 0,89 ± 0,38. (B) C₅₇Bl/6 ohne LPS: 0,09 ± 0,03; C₅₇Bl/6 + LPS: 3,29 ± 1,50; C₅₇Bl/6 + BAY 60-6583: 0,83 ± 0,47; C₅₇Bl/6 + PSB 1115: 2,21 ± 0,30. (C) C₅₇Bl/6 ohne LPS: 0,00 ± 0,00; C₅₇Bl/6 + LPS: 1,72 ± 0,27; C₅₇Bl/6 + BAY 60-6583: 1,54 ± 0,60; C₅₇Bl/6 + PSB 1115: 1,01 ± 0,37). Die Behandlung mit dem Antagonisten PSB 1115 ergab keine eindeutigen Ergebnisse. Es gibt weder im vaskulären noch im interstitiellen oder im alveolären Raum einen signifikanten Unterschied zwischen der Mäusegruppe, die mit dem Antagonisten behandelt wurde, und der Kontrollgruppe 24 h nach LPS-Gabe.

Ergebnisse

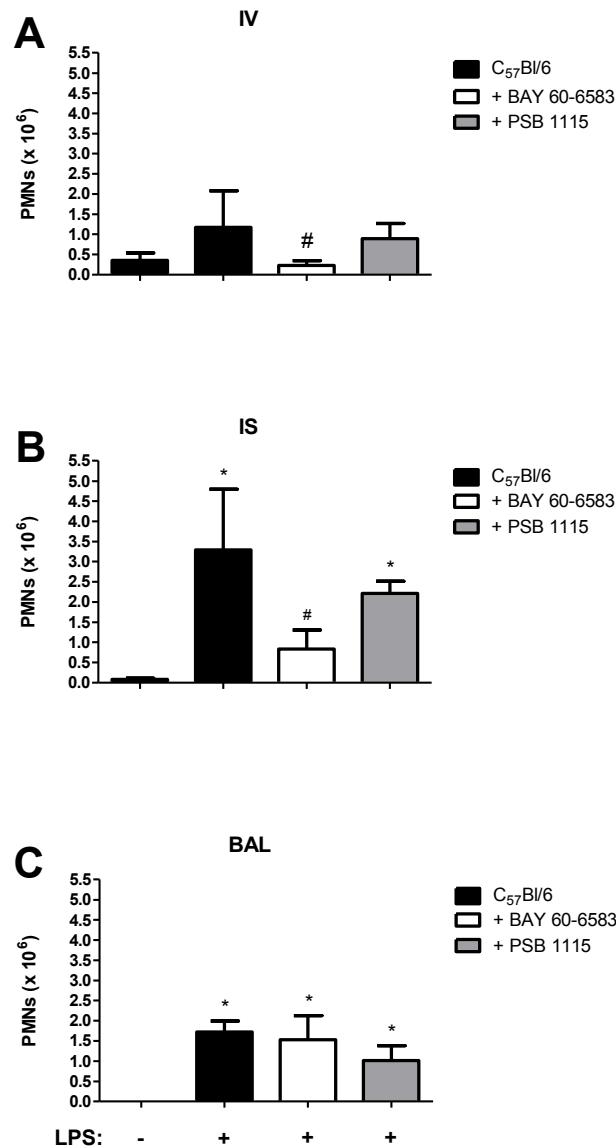


Abbildung 15: Einfluss des A_{2B}AR-Agonisten BAY 60-6583 auf die Migration neutrophiler Granulozyten. Migration neutrophiler Granulozyten ohne und 24 h nach LPS-Gabe in Wildtypmäusen (schwarze Balken), die eine Stunde vor LPS-Gabe mit dem A_{2B}AR-Agonisten BAY 60-6583 (nicht gefüllte Balken) oder mit dem Antagonisten PSB 1115 (graue Balken) behandelt wurden. Abgebildet sind die Auswirkungen im vaskulären (A, IV), im interstitiellen (B, IS) und im alveolären Raum (C, BAL). Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 3–6 Experimenten. # p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe nach LPS-Gabe ohne Behandlung mit dem Agonisten. * p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS-Gabe.

Ergebnisse

Unter dem Aspekt, dass die Behandlung mit dem A_{2B}AR-Agonisten und -Antagonisten einen Effekt auf die Permeabilität ausüben könnte, wurde diese erneut untersucht. Bei der Behandlung mit dem Agonisten (1 mg/kg Körpergewicht) ließ sich ein signifikanter Unterschied feststellen. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse ist Abbildung 16 zu entnehmen. Die Permeabilität nimmt in Wildtypmäusen nach der Behandlung mit LPS deutlich zu (vgl. Kapitel 3.5). Bei vorangegangener Gabe des A_{2B}AR-Agonisten (BAY 60-6583) ist die Permeabilität im Vergleich zur Versuchskontrolle ohne Gabe des Agonisten signifikant niedriger (C₅₇Bl/6: 118,7 ± 35,7; C₅₇Bl/6 + LPS: 220,4 ± 21,5; C₅₇Bl/6 + LPS + BAY 60-6583: 74,3 ± 38,8).

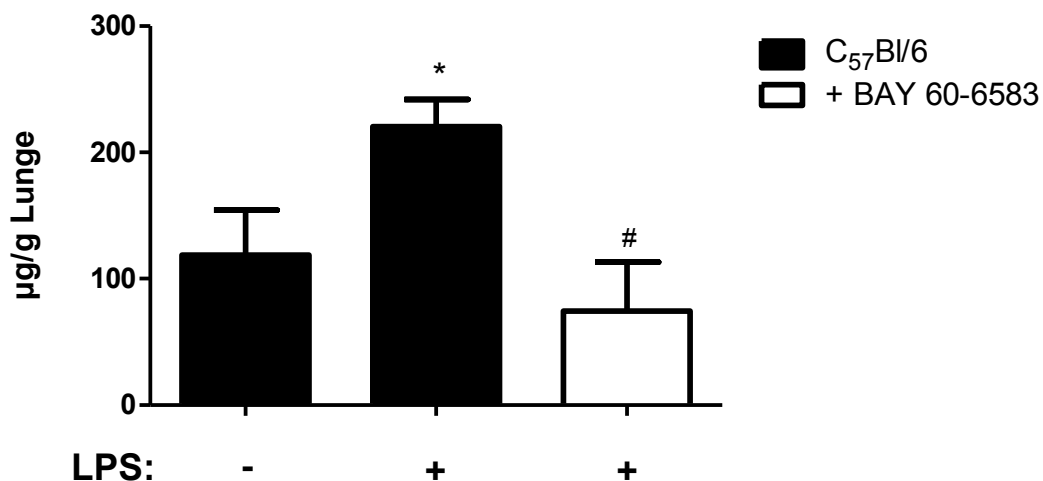


Abbildung 16: Einfluss des A_{2B}AR-Agonisten (BAY 60-6583) auf die Permeabilität. Die Inhalation mit LPS führt zu einer vermehrten Permeabilität der alveolär-kapillären Membranen. Dabei ergibt sich bei vorangegangener Gabe des A_{2B}AR-Agonisten BAY 60-6583 eine signifikant niedrigere Permeabilität bei sonst gleicher Behandlung. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 6 Experimenten. * p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS. # p < 0,05 gegenüber der Mäusegruppe ohne vorangegangene Behandlung mit BAY 60-6583.

3.8 Migration neutrophiler Granulozyten in vitro

Zur Verifizierung der Ergebnisse der In-vivo-Versuche wurden Transmigrationsversuche mit humanen PMNs, humanen Lungenepithel- (A549) und Lungendothelzellen (HMVEC-L) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Der Versuchsablauf beinhaltet drei Bedingungen:

1. Die PMNs werden mit BAY 60-6583 vorbehandelt (A + D).
2. Epithel bzw. Endothel wird mit BAY 60-6583 vorbehandelt (B + E).
3. Sowohl PMNs als auch Epithel bzw. Endothel werden mit BAY 60-6583 vorbehandelt (C + F).

Die Behandlung der PMNs mit dem Agonisten (Abb. 17, A + D) hat einen protektiven Effekt, es wandern signifikant weniger PMNs durch das Epithel bzw. Endothel. ((A) Kontrolle: $251\ 012 \pm 32\ 446$; Behandlung der PMNs mit BAY 60-6583 10 ng/ml: $98\ 249 \pm 20\ 711$; 1 ng/ml: $67\ 402 \pm 14\ 445$; 0,1 ng/ml: $57\ 427 \pm 14\ 130$. (D) Kontrolle: $422\ 689 \pm 7\ 131$; Behandlung der PMNs mit BAY 60-6583 10 ng/ml: $117\ 467 \pm 26\ 764$; 1 ng/ml: $144\ 811 \pm 68\ 701$; 0,1 ng/ml: $139\ 058 \pm 19\ 099$.)

Die Grafiken B und E in Abbildung 17 zeigen die Migration der jetzt unbehandelten PMNs durch das mit dem Agonisten vorbehandelte Epithel bzw. Endothel. Die isolierte Behandlung des Epithels hat keine Wirkung auf die Migration der PMNs (E). Bei der Behandlung des Endothels lässt sich ein Effekt ausmachen (B), es wandern signifikant weniger PMNs. ((B) Kontrolle: $343\ 535 \pm 11\ 396$; Behandlung des Endothels mit BAY 60-6583 10 ng/ml: $219\ 754 \pm 27\ 583$; 1 ng/ml: $194\ 416 \pm 14\ 541$; 0,1 ng/ml: $168\ 258 \pm 5\ 371$. (E) Kontrolle: $266\ 910 \pm 38\ 713$; Behandlung des Epithels mit BAY 60-6583 10 ng/ml: $253\ 435 \pm 28\ 894$; 1 ng/ml: $245\ 495 \pm 13\ 877$; 0,1 ng/ml: $270\ 996 \pm 4\ 407$.)

Die stärkste Wirkung hat der Agonist allerdings, wenn sowohl PMNs als auch Epithel bzw. Endothel behandelt werden (Abb. 17, C + F). Die Anzahl der migrierten PMNs ist nach der Behandlung signifikant gesunken. ((C) Kontrolle: $262\ 994 \pm 5\ 895$; Behandlung der PMNs und Endothel mit BAY 60-6583 10 ng/ml: $52\ 289 \pm 16\ 590$; 1 ng/ml: $51\ 484 \pm 8\ 798$; 0,1 ng/ml: $38\ 332 \pm 16\ 189$. (F) Kontrolle: $298\ 087 \pm 21\ 304$; Behandlung von PMNs und Epithel mit BAY

Ergebnisse

60-6583 10 ng/ml: $71\,325 \pm 6\,706$; 1 ng/ml: $75\,925 \pm 2\,387$; 0,1 ng/ml: $67\,717 \pm 17\,896$.)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass BAY 60-6583 den protektiven Effekt von $A_{2B}AR$ bei der Migration neutrophiler Granulozyten unterstützt.

Dieselben Transmigrationsversuche wurden auch mit dem $A_{2B}AR$ -Antagonisten PSB 1115 durchgeführt. Allerdings war hier kein eindeutiger Effekt feststellbar. Aus diesem Grund wird auf eine grafische Darstellung verzichtet.

Ergebnisse

HMVEC-L

A549

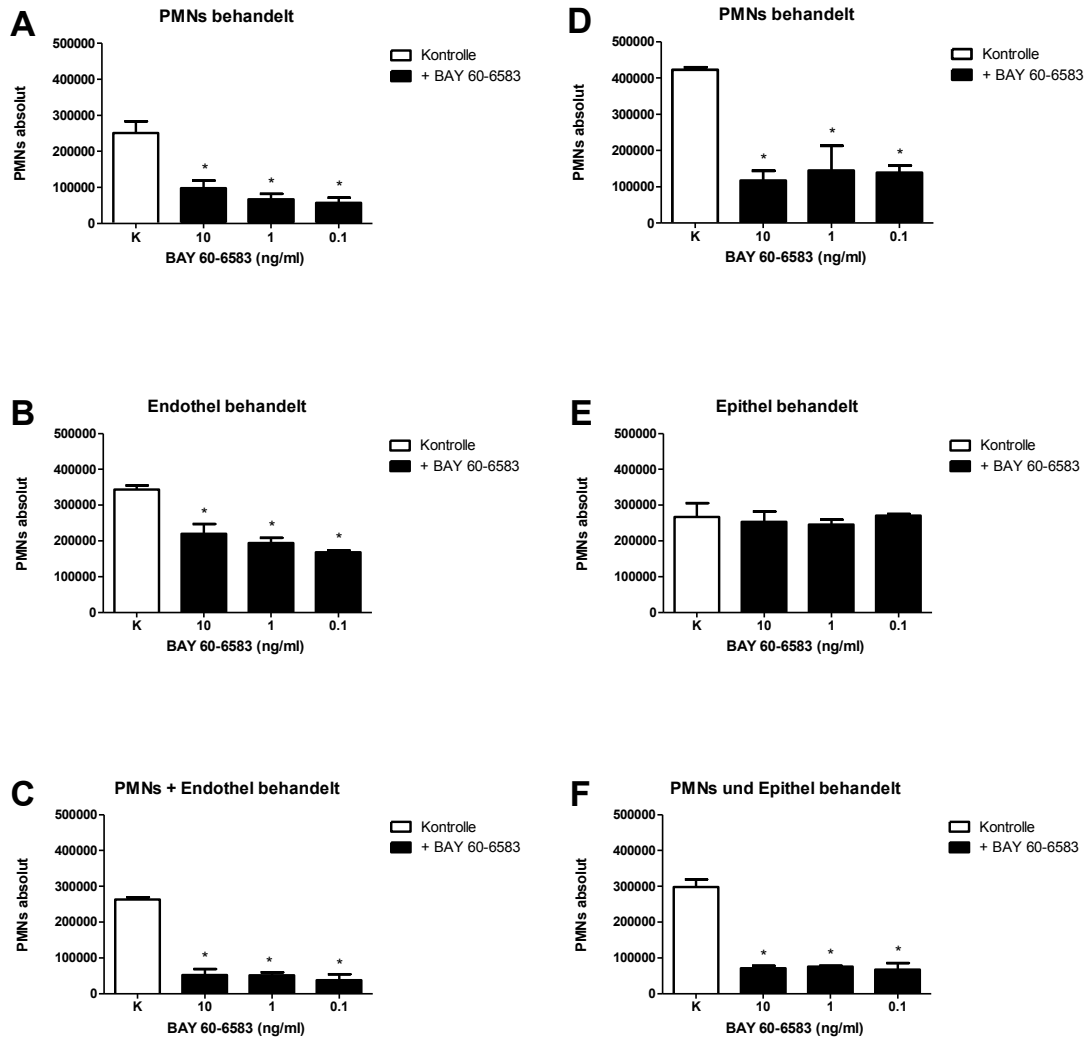


Abbildung 17: Transmigrationsversuch in vitro. Anzahl humaner PMNs, die durch humane Endothel- (HMVEC-L, Grafiken A, B, C) und Epithelzellen (A549, Grafiken D, E, F) migriert sind (nicht gefüllte Balken). Zusätzlich erfolgte eine Behandlung mit dem A_{2B}AR-Agonisten BAY 60-6583 (schwarze Balken). Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 2 Experimenten. * p < 0,05 gegenüber der Kontrollgruppe ohne Agonistbehandlung.

4 Diskussion

4.1 Rolle von A_{2B}AR bei der Migration neutrophiler Granulozyten

Die funktionelle Rolle von A_{2B}AR im akuten inflammatorischen Geschehen konnte mittels Real-timeRT-PCR im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Zwei bis drei Stunden nach LPS-Exposition steigt die Transkription von A_{2B}AR an. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Untersuchungen. Die Transkription von A_{2B}AR steigt nach Behandlung mit unterschiedlichen inflammatorischen Stimuli, u. a. auch LPS, an (Eltzschig et al. 2003:791, Eckle et al. 2007:1587, Nemeeth et al. 2003:1048, Xaus et al. 1999:3611, Khoa et al. 2003:3994). Besondere Beachtung gilt der Arbeit von Schingnitz et al. (2010:5275). Sie zeigen einen deutlichen Anstieg des A_{2B}AR-Transkriptionslevels um das Sechsfache im Vergleich zur Kontrollgruppe 4 h nach LPS-Gabe. Das von Schingnitz et al. verwendete In-vivo-Modell ist identisch mit dem verwendeten In-vivo-Modell dieser Arbeit. Der Anstieg der Transkriptionslevel der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist nicht so ausgeprägt, allerdings werden die Transkriptionslevel im Vergleich zu Schingnitz et al. zu anderen Zeitpunkten betrachtet. Es besteht somit die Möglichkeit, dass eine weitere Erhöhung der Transkriptionslevel zwischen drei und vier Stunden erfolgt.

Zur genauen Untersuchung von Unterschieden im Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten in A_{2B}AR^{-/-}- und Wildtypmäusen wurde ein In-vivo-Modell verwendet, das es erlaubt, die Anzahl von PMNs im vaskulären, interstitiellen und alveolären Raum zu bestimmen (Reutershan et al. 2005:L808; Ngamsri et al. 2010:4375; Wagner et al. 2010:L503). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass nach LPS-Gabe in den Wildtypkontrollen weniger PMNs in das Lungeninterstitium einwandern als in A_{2B}AR-Knock-out-Mäusen. Das bedeutet, dass die Wirkung von extrazellulärem Adenosin über den Adenosinrezeptor A_{2B} antiinflammatorisch und damit protektiv ist. Der protektive Effekt von extrazellulärem Adenosin wurde schon in mehreren vorausgegangenen Studien demonstriert. Zum Beispiel zeigen Reutershan et al. in ihrer Arbeit, dass in

Knock-out-Mäusen ohne CD 39 und CD 72, welche Schlüsselenzyme in der Bildung von extrazellulärem Adenosin sind, eine vermehrte Migration von neutrophilen Granulozyten in die Lunge stattfindet (Reutershan et al. 2009). Der in dieser Arbeit geführte Nachweis über die verstärkte Migration der neutrophilen Granulozyten in die Lunge von Mäusen, die $A_{2B}AR$ nicht exprimieren können, belegt, dass der antiinflammatorische Effekt von extrazellulärem Adenosin durch den Adenosinrezeptor A_{2B} reguliert wird. Mithilfe des im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Modells können die absoluten Zellzahlen in Knock-out-Mäusen und Wildtypmäusen in vivo bestimmt werden. Somit gelingt im Vergleich zu anderen Arbeiten (z. B. Schingnitz et al. 2010) ein direkter Nachweis darüber, wie viele PMNs in die drei unterschiedlichen Lungenkompartimente (vaskulär, interstitiell und alveolär) einwandern und inwiefern dies in einem akut entzündlichen Prozess durch $A_{2B}AR$ abgeschwächt wird.

Die antiinflammatorische Wirkung von Adenosin durch $A_{2B}AR$ an unterschiedlichen Geweben wurde in mehreren Studien mit verschiedenen Modellen gezeigt (unter den jüngeren Studien vgl. insbesondere Eckle et al. 2008b:3301, Yang et al. 2008:792, Eckle et al. 2007, Eltzschig et al. 2004, Grenz et al. 2008). Die Ergebnisse der Migrationsversuche zeigen, dass die Mehranreicherung der PMNs im Interstitium am stärksten ausgeprägt ist. Dies konnte auch anhand der histologischen und immunhistochemischen Bilder, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden, belegt werden (vgl. Abb. 7 und 8). Es zeigt sich eine verminderte Migration der neutrophilen Granulozyten in die Lunge der Wildtypmäuse im Vergleich zu den $A_{2B}AR$ -Knock-out-Mäusen. Auf den immunhistochemisch untersuchten Schnittbildern ist dies durch die spezielle Anfärbung der neutrophilen Granulozyten deutlicher zu erkennen als auf den histologischen Schnittbildern. Dieses Ergebnis wird in der neueren Literatur bestätigt. Schingnitz et al. zeigen an histologischen Schnittbildern (HE-Färbung) der Mäuselungen von Knock-out-Tieren und Wildtyptieren, dass nach LPS-Gabe in Wildtypmäusen im Vergleich zu $A_{2B}AR^{-/-}$ -Mäusen vermindert PMNs in die Lunge einwandern (Schingnitz et al. 2010:5276). Auch in einer Studie von Eckle et al. ist in histologischen Schnittbildern (HE-Färbung) eine vermehrte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge von Knock-out-Mäusen zu erken-

nen. Im Unterschied zu dieser Arbeit wurde die Lungenschädigung durch mechanische Ventilation hervorgerufen (Eckle et al. 2008b:3303). Yang et al. konnten ebenso in immunhistochemisch untersuchten Schnittbildern nach Gefäßverletzung der A.femoralis durch einen Führungsdraht in $A_{2B}AR$ -Knock-out-Mäusen eine vermehrte Migration von Leukozyten im Vergleich zur Wildtypkontrolle feststellen (Yang et al. 2008:794). Zum Ausschluss erhöhter absoluter Zellzahlen wurden die Gesamtzellzahlen bestimmt und Differentialblutbilder von Knock-out-Tieren und Wildtypkontrollen angefertigt.

Um einen genaueren Überblick über den zeitlichen Verlauf des Migrationsgeschehens zu erlangen und um daraus eine Erklärung für die Unterschiede im Migrationsverhalten abzuleiten, wurden Migrationsversuche in $A_{2B}AR$ -Knock-out- und Wildtypmäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

Hier zeigt sich, dass sich zwischen drei und zwölf Stunden nach LPS-Gabe die PMNs vermehrt in den pulmonalen Gefäßen befinden (vgl. Abb. 10, A, IV). Dies lässt darauf schließen, dass die PMNs in der Zeit zwischen drei und zwölf Stunden nach LPS-Gabe an das Endothel adhären und zu migrieren beginnen (vgl. Kapitel 1.3). Nach 24 Stunden ist der Großteil dieser PMNs in das Interstitium migriert (vgl. Abb. 10, B, IS), weshalb zu diesem Zeitpunkt im vaskulären Raum zwischen den Gruppen der Knock-out-Tiere und Wildtypiere sowie zwischen den Gruppen, die LPS inhalierten, und den Kontrollgruppen ohne LPS-Inhalation kein Unterschied mehr sichtbar ist. In den Knock-out-Tieren ist im Vergleich zu den Wildtypmäusen eine vermehrte Anreicherung der PMNs in den pulmonalen Gefäßen zu erkennen (vgl. Abb. 10, A, IV). Dies ist dadurch zu erklären, dass es in Knock-out-Mäusen zu einer verstärkten Adhärenz der PMNs am Endothel sowie zu einem verstärkten Rollen kommt. Eine Studie von Yang et al., die intravital eine verstärkte Adhärenz und verstärktes Rollen von Leukozyten in $A_{2B}AR^{-/-}$ -Mäusen beobachten konnten, unterstützt dies. Zudem wird in dieser Arbeit gezeigt, dass in $A_{2B}AR$ -Knock-out-Mäusen vermehrt Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin, P-Selektin und ICAM-1 auf Arterienendothel exprimiert werden (Yang et al. 2006:1917 f.). Auch Wakai et al. zeigen in einer älteren In-vitro-Studie, dass Adenosin über seine Wechselwirkung mit dem

A_{2B}AR die Migration neutrophiler Granulozyten über Endothel verhindert (Wakai et al. 2001).

Nachdem sich die PMNs fest an das Endothel angeheftet haben, migrieren sie durch das Endothel ins Interstitium (vgl. Kapitel 1.3 und Abbildung 2). Da dies in den Knock-out-Mäusen durch den fehlenden A_{2B}-AR nicht abgebremst wird (s. o.), kommt es im Vergleich zur Wildtypkontrolle zum verstärkten Einwandern neutrophiler Granulozyten ins Lungeninterstitium. Dies erklärt die signifikant höhere Anzahl an PMNs im Interstitium nach 24 Stunden.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse der Migrationsversuche in der bronchoalveolären Lavage erst nach 48 Stunden einen signifikanten Unterschied zwischen A_{2B}AR^{-/-}-Mäusen und C₅₇Bl/6-Mäusen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die hohe Anzahl an PMNs im Interstitium dazu führt, dass in den Knock-out-Mäusen auch nach 48 Stunden noch PMNs in den alveolären Raum migrieren, wohingegen die PMNs in den Kontrolltieren nach 48 Stunden im Interstitium fast nicht mehr nachzuweisen sind. Da der Abfall der PMNs sowohl interstitiell als auch alveolär gleichermaßen erfolgt, kann ein schnellerer oder vermehrter Abbau der PMNs in den Wildtypmäusen ebenso ausgeschlossen werden wie ein langsamerer oder verminderter Abbau in den Knock-out-Mäusen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass PMNs in Knock-out-Mäusen verstärkt adhären, dadurch vermehrt migrieren und durch die große Anzahl der PMNs länger im Interstitium verweilen und aufgrund dessen auch über einen längeren Zeitraum als in den Kontrollmäusen in die Alveolen migrieren.

Um zu untersuchen, ob die protektive Wirkung von Adenosin über A_{2B}AR auf hämatopoetischen Zellen oder auf Gewebezellen vermittelt wird, wurden im Rahmen dieser Dissertation Migrationsversuche mit chimären Tieren durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen machen deutlich, dass der protektive Effekt durch A_{2B}AR auf hämatopoetischen Zellen vermittelt wird. Wie bei den zuvor diskutierten Ergebnissen des Migrationsverhaltens finden sich im vaskulären Raum keinerlei Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Erst bei Betrachtung des interstitiellen Raumes wird ein Unterschied deutlich, was

den protektiven Effekt von extrazellulärem Adenosin eindeutig dem Adenosinrezeptor A_{2B} auf Blutzellen zuordnet (vgl. Abb. 11). Hier wandern in der Gruppe, die A_{2B} AR auf Blutzellen trägt, signifikant weniger PMNs in das Lungeninterstitium ein. In der bronchoalveolären Lavage ist dieser Effekt ebenfalls zu erkennen. Diese Ergebnisse werden durch Ergebnisse anderer Arbeiten unterstützt. So beschreiben Yang et al. eine vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine, also eine verstärkte Entzündungsreaktion, nach intraperitonealer LPS-Gabe in A_{2B} AR-Knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen. Hierfür wird in In-vivo-Versuchen mit chimären Mäusen die Wirkung von extrazellulärem Adenosin am A_{2B} AR auf Gewebezellen verantwortlich gemacht. Ein Anstieg proinflammatorischer Zytokine ist bei A_{2B} AR auf hämatopoetischen Zellen nicht zu erkennen. Folglich kommt A_{2B} AR auf hämatopoetischen Zellen, insbesondere Makrophagen, eine antiinflammatorische Rolle zu (Yang et al. 2006:1918 ff.). Dass es in Mäusen, die den Rezeptor auf hämatopoetischen Zellen tragen, zu einer geringeren Einwanderung von PMNs kommt, zeigten auch Eckle et al., allerdings an einem anderen Modell. Dabei wird die Lungenschädigung durch Hypoxie und nicht wie in dieser Arbeit beschrieben durch Endotoxin herbeigeführt (Eckle et al. 2008a:2033).

Im Gegensatz dazu existieren auch Arbeiten, auf Grundlage derer zu erwarten gewesen wäre, dass die protektive Wirkung von Adenosin durch A_{2B} AR auf Endothel- und Epithelzellen vermittelt wird. Schingnitz et al. zeigen dies anhand desselben In-vivo-Modells, welches auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Es kommt in den Mäusen, die den Rezeptor auf Gewebezellen tragen, zu einem geringeren Anstieg der Transkriptionslevel von IL-6 sowie zu einer geringeren Ausprägung des Lungenödems als in den Mäusen, die den A_{2B} AR auf hämatopoetischen Zellen tragen (Schingnitz et al. 2010:5277). Auch die Ergebnisse von Eckle et al. ergeben für A_{2B} AR auf Lungengewebe eine protektive Rolle. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum beatmungsinduzierten ALI gemacht, die Lungenschädigung also durch maschinelle Beatmung hervorgerufen (Eckle et al. 2008b:3309).

Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass sich die Modelle, aber auch die Auslöser der Lungenschädigung unterscheiden. Das be-

deutet, dass die Aktivierung von $A_{2B}AR$ und die Auswirkungen dieser Aktivierung davon abhängig sind, durch welchen Stimulus die Aktivierung erfolgt und ob die Lungenschädigung akut oder chronisch ist. Die duale Rolle (sowohl anti- als auch proinflammatorische Wirkung) von $A_{2B}AR$ wurde von Zhou et al. (2011) an einem In-vivo-Modell untersucht. Sie zeigen in ihrer Arbeit, dass bei einer durch lokale Gabe von Bleomycin hervorgerufenen akuten Lungenschädigung Adenosin über $A_{2B}AR$ antiinflammatorisch wirkt, wohingegen bei systemischer Gabe von Bleomycin kein Unterschied zwischen $A_{2B}AR$ -Knock-out- und Wildtypmäusen zu erkennen ist. Dagegen entwickelt sich bei systemischer Gabe von Bleomycin eine moderate Entzündungsreaktion mit anschließender Fibrosierung. In den $A_{2B}AR$ -Knock-out-Mäusen ist die Lungenfibrose weniger ausgeprägt als in den Kontrollmäusen. Der Adenosinrezeptor A_{2B} nimmt folglich bei der chronischen Phase der Lungenschädigung eine profibrotische Rolle ein (Zhou et al 2011:1097 ff.). Auch in anderen Studien zeigt sich, dass dauerhaft erhöhte Adenosinspiegel zu einer Progression von chronischen Lungenerkrankungen führen (Sun et al. 2006:2180; Blackburn 2003:69). Zudem scheint es eine Rolle zu spielen, auf welche Weise der Stimulus für das Entzündungsgeschehen appliziert wird. Neben Zhou et al. wurde auch in anderen Arbeiten LPS intraperitoneal appliziert. Allerdings deuten die Ergebnisse auf eine proinflammatorische Wirkung von $A_{2B}AR$ hin (Ryzhov et al. 2008:698). In der vorliegenden Dissertation wurde das Entzündungsgeschehen über eine LPS-Inhalation (lokal) ausgelöst und es kam zu einer akuten Lungenschädigung. Die Versuchsergebnisse zeigen eine antiinflammatorische Wirkung von $A_{2B}AR$.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, aber auch die aktuelle Literatur machen deutlich, dass $A_{2B}AR$ eine entscheidende Rolle in der Migration der PMNs zukommt. Wann diese Wirkung durch $A_{2B}AR$ auf hämatopoetischen Zellen oder auf Gewebezellen vermittelt wird, ist möglicherweise abhängig vom Auslöser und bedarf noch weiterer Forschung. Auch die paradoxe Wirkung – das heißt antiinflammatorisch im Rahmen einer akuten Lungenschädigung und profibrotisch im Rahmen chronischer Lungenerkrankungen, wie Asthma oder chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), oder proinflammatorisch nach systemischer

Gabe des Entzündungsstimulus – ist noch nicht hinreichend erforscht und bietet daher neue Forschungsansätze für die Zukunft.

4.2 Auswirkungen von A_{2B}AR auf die pulmonale Barrierefunktion, Zytokine und Chemokine

Neben der Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Lunge ist ein weiteres Schlüsselereignis bei der Entstehung des ALI die vermehrte Permeabilität der kapillär-alveolären Membranen. Das sich daraus entwickelnde Leitsymptom ist das Lungenödem (Bernard et al. 1994:819).

In dieser Studie wurde die pulmonale Barrierefunktion mittels Evans blue Extravasation untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine vermehrte Permeabilität in den verwendeten A_{2B}AR-Knock-out-Tieren im Vergleich zu den Wildtypmäusen nach LPS-induzierter Lungenschädigung (vgl. Abb. 12). Somit zeigt sich hier ein protektiver Effekt von A_{2B}AR auf die pulmonale Barrierefunktion. Diese Versuchsergebnisse und die Ergebnisse der Migrationsversuche bestätigen damit die protektive Wirkung von Adenosin am A_{2B}AR. In der Versuchsreihe ohne LPS-Gabe lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen.

Der Einfluss von Adenosin auf die Barrierefunktion wurde schon in einigen vorangegangenen Studien nachgewiesen. Zum Beispiel konnten Reutershan et al. zeigen, dass in Knock-out-Mäusen ohne CD39 und CD73 – welches Schlüsselenzyme in der Bildung von Adenosin aus Vorläufermolekülen sind – das pulmonale Entzündungsgeschehen wie auch das Lungenödem sehr viel stärker ausgeprägt waren als in den Kontrolltieren (Reutershan et al. 2009:478).

Auch in einer In-vivo-Studie mit A_{2A}AR wurde mittels des gleichen Versuchsaufbaus eine gesteigerte Permeabilität in den A_{2A}AR-Knock-out-Tieren nachgewiesen (Reutershan et al. 2007). Die Ergebnisse können allerdings nur eingeschränkt miteinander verglichen werden, da in der Arbeit von Reutershan et al. ein anderer Adenosinrezeptor untersucht wurde.

In Bezug auf den A_{2B}AR wurde in Studien bei Aktivierung des Rezeptors ein protektiver Effekt auf die Permeabilität beschrieben. Zum Beispiel konnten Eckle et al. in einer Studie nachweisen, dass in A_{2B}AR-Knock-out-Mäusen sowohl ein erhöhter Albumingehalt in der BAL als auch ein vermehrtes Lungenödem,

also eine erhöhte Permeabilität, zu finden sind. Allerdings wurde hier die Lungenschädigung durch mechanische Beatmung herbeigeführt (Eckle et al. 2008b:3303). Auch im Hypoxie-induzierten ALI-Modell von Eckle et al. zeigen A_{2B} AR-Knock-out-Mäuse nach Stimulation mehr Lungenödem und mittels Evans blue eine verstärkte Permeabilität (Eckle et al. 2008a:2028). Schingnitz et al. konnten ebenfalls eine stärkere Ausprägung des Lungenödems in A_{2B} AR-Knock-out-Tieren gegenüber den Wildtypkontrollen nachweisen. Bei dieser Studie handelt es sich um ein Modell mit Endotoxin-induzierter Lungenschädigung (Schingnitz et al. 2010:5276).

Sowohl das Modell zur Auslösung der Lungenschädigung mittels LPS-Inhalation (Schingnitz et al. 2010:5276, Ngamsri et al. 2010:4375; Wagner et al. 2010:L503) wie auch die Gabe von Evans blue (Reutershan et al. 2007:1256; Eckle et al. 2008a:2033; Ngamsri et al. 2010:4375; Wagner et al. 2010:L503) wurden zuvor verwendet und sind etabliert. Die Ergebnisse der Evans-blue-Versuche dieser Arbeit werden durch die Ergebnisse der oben genannten Studien unterstützt. Allerdings konnte die vermehrte Permeabilität in A_{2B} AR-Knock-out-Tieren unter Normalbedingungen, so wie sie von Eckle et al. beobachtet wurde, nicht nachgewiesen werden (Eckle et al. 2008a:2029). Zu beachten ist, dass A_{2B} AR von allen Adenosinrezeptoren die geringste Affinität für Adenosin hat und unter physiologischen Bedingungen nicht aktiviert wird (Fredholm et al. 2001b:446). Eine weitere Ursache für die gegensätzlichen Ergebnisse könnte die unterschiedliche Zirkulationsdauer von Evans blue sein. In der Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit erhielten die Versuchstiere 30 min vor Versuchsbeginn Evans blue, bei Eckle et al. vier Stunden vor Versuchsbeginn. Bei Inflammation bzw. Schädigung der Lunge ist auch nach kurzer Zeit (30 min) schon ein Unterschied zu erkennen. Unter Normalbedingungen ist die erhöhte Permeabilität durch die Evans-blue-Anreicherung erst nach einiger Zeit nachweisbar und kann deshalb anhand des verwendeten Versuchsablaufs im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht belegt werden.

Um die vermehrte Permeabilität entweder der Wirkung von A_{2B} AR auf hämatopoetischen Zellen oder A_{2B} AR auf Gewebezellen zuzuordnen, wurde die Barrie-

refunktion auch in chimären Mäusen untersucht. Hierbei zeigen die Ergebnisse wie auch schon im Migrationsversuch, dass die protektive Wirkung, also die Reduktion der Permeabilität gegenüber den $A_{2B}AR$ -Knock-out-Mäusen, von $A_{2B}AR$ auf hämatopoetischen Zellen vermittelt wird (vgl. Abb. 13). Eine Reduktion ist auch bei der Versuchsgruppe, die $A_{2B}AR$ auf Gewebezellen trägt, zu erkennen, allerdings ist dieser Effekt nicht signifikant. Möglich ist, dass es hier zu einem Zusammenspiel der Adenosinrezeptoren auf Blut- und Gewebezellen kommt. Im Gegensatz zu dieser Arbeit zeigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen eine protektive Wirkung für $A_{2B}AR$ auf Gewebezellen. Eckle et al. beobachteten in ihren Versuchen zum Hypoxie-induzierten ALI eine verminderte Permeabilität bei $A_{2B}AR$ auf Gewebe bzw. Epithel und Endothel (Eckle et al. 2008a:2031). Auch Schingnitz et al. wiesen in ihrer Arbeit vermehrtes Lungenödem nach und machten für die vermehrte Permeabilität $A_{2B}AR$ auf Blutzellen verantwortlich (Schingnitz et al. 2010:5277). Allerdings kann die Arbeit von Schingnitz et al. nur eingeschränkt mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen werden, da als Maß für die Lungenpermeabilität das Lungenwasser als Verhältnis von nassem zu getrocknetem Lungengewebe angegeben wird und nicht wie im Rahmen dieser Arbeit mittels Evans blue. Die gegensätzlichen Ergebnisse können durch die unterschiedlichen Auslöser bzw. durch die unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Barrierefunktion erklärt werden.

Durch inflammatorische Stimuli wie LPS werden Zytokine und Chemokine von Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelzellen ausgeschüttet. Neutrophile Granulozyten wandern durch diese Zytokine getriggert entlang des Chemokingradienten in die Lunge (vgl. Kapitel 1.3 und 1.4).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass drei Stunden nach LPS-Gabe die Konzentrationen der Zytokine IL-6 und TNF- α sowie der Chemokine CXCL 1 und 2/3 sowohl in den Knock-out-Mäusen als auch in den Wildtypmäusen im Vergleich zu den Negativkontrollen ansteigen (vgl. Abb. 14). Der Anstieg der Zytokine und Chemokine ist charakteristisch für die frühe Phase einer akuten Entzündungsreaktion und entscheidend für die Migration neutrophiler Granulozyten (Reutershan et al. 2006:695; Moser, Loetscher 2001:123).

Die Ergebnisse decken sich folglich mit der aktuellen Literatur. Ein Unterschied zwischen den beiden Mäusestämmen mit LPS-Behandlung ließ sich hingegen nicht feststellen. Dies erscheint dahingehend verwunderlich, dass ein Anstieg der Zytokine und Chemokine am ehesten in den BAL der Knock-out-Mäuse zu erwarten gewesen wäre, weil in den Knock-out-Mäusen auch eine verstärkte Migration neutrophiler Granulozyten in die Lunge beobachtet werden konnte (vgl. Kapitel 3.4).

Hierfür lassen sich einige Gründe anführen. Zum einen muss bedacht werden, dass die Inhalation mit LPS einen direkten und sehr starken Reiz für die Alveolarmakrophagen und Pneumozyten Typ II darstellt, Zytokine und Chemokine zu produzieren. Zudem ist verständlich, dass die Produktion und der Abbau von Zytokinen und Chemokinen nicht beliebig gesteigert werden können, sodass hier eine Obergrenze erreicht ist, die auch in den Knock-out-Mäusen nicht weiter gesteigert werden kann. Zum anderen ist zu bedenken, dass Adenosin nicht nur auf $A_{2B}AR$, sondern auch auf die anderen Adenosinrezeptoren (A_1 , A_{2A} , A_3) wirkt und diese sich in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen. Ähnliche Ergebnisse zeigt die Arbeit von Ngamsri et al. zum Adenosinrezeptor A_1 . Hier ließ sich in der BAL nach LPS-Gabe ebenfalls kein Unterschied zwischen den Knock-out-Mäusen und den entsprechenden Wildtypkontrollen feststellen. Erst nach Gabe eines selektiven Agonisten war in den Wildtypmäusen eine signifikante Reduktion der Chemokin- und Zytokinkonzentrationen zu beobachten (Ngamsri et al. 2010:4382).

Andere bis dato veröffentlichte Studien zeigten einen vermehrten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine in den $A_{2B}AR$ -Knock-out-Mäusen gegenüber den Wildtyptieren (Schingnitz et al. 2010:5275; Eckle et al. 2008b:3303). Allerdings ist zu beachten, dass nicht die Konzentrationen der Zytokine und Chemokine bestimmt wurden, sondern die Transkriptionslevel der Zytokine aus Lungengewebe vier Stunden nach LPS-Inhalation (Schingnitz et al. 2010:5272) bzw. für die Zytokin-ELISAs (Eckle et al. 2008b) homogenisiertes Lungengewebe verwendet wurde. Zytokin- und Chemokinkonzentrationen unterscheiden sich je nach Kompartiment (z. B. Plasma und BAL). Somit sind die unterschied-

lichen Ergebnisse kein Widerspruch, sondern auf die verschiedenen Modelle zurückzuführen.

4.3 Therapeutische Möglichkeiten

Acute Lung Injury und *Acute Respiratory Distress Syndrome* sind auch heute noch Komplikationen bei schwer kranken Menschen und mit einer hohen Letalität vergesellschaftet (vgl. Kapitel 1.1). Die Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich im Wesentlichen auf die Beseitigung der Ursache und supportive Maßnahmen, insbesondere verbesserte Beatmungsstrategien (Cepkova und Matthay 2006:15). Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen eine funktionelle Rolle von A_{2B}AR bei der Entstehung akuter inflammatorischer Prozesse der Lunge. Aufgrund seiner Rolle sollten pharmakologische Strategien in Bezug auf diesen Adenosinrezeptor in Erwägung gezogen werden.

Eines der Schlüsselereignisse im akuten inflammatorischen Prozess bzw. im *Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome* ist die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Lunge (Abraham 2003). Einerseits spielen neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle bei der Erregerabwehr und haben somit eine schützende Wirkung (Smith 1994:673). Andererseits kommt es bei ALI/ARDS zu einer Art überschießender Reaktion der PMNs. Die schützende Wirkung wird bei der Betrachtung von Krankheitsbildern deutlich, denen Granulozytenfunktionsbeeinträchtigungen bzw. ein Verlust der Funktionalität zugrunde liegen. Daraus resultiert eine geschwächte Infektabwehr. Zu nennen sind zum Beispiel die Leukopenie und das Leukozytenadhärenzdefekt-Syndrom (LAD). Bei den meisten Erkrankungen dieser Art sind akute inflammatorische Prozesse stärker ausgeprägt und haben einen schlechteren Verlauf. Bei einer überschießenden Reaktion dagegen schütten die PMNs vermehrt hydrolytische Enzyme und Oxidantien aus und führen so zu Gewebnekrosen und letztendlich zu einer Funktionseinschränkung der Lunge mit zum Teil letalem Ende (vgl. Kapitel 1.1 und 1.3).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Migrationsversuche in vivo mit Mäusen und – zur Klärung der Frage, ob sich die Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen –, Transmigrationsversuche in vitro mit humanen Zellen durchgeführt. Die Versuchsmäuse und Zellen wurden entweder mit dem

A_{2B}AR-Agonisten BAY 60-6583 oder dem A_{2B}AR-Antagonisten PSB 1115 behandelt. Die Ergebnisse des Migrationsversuches in vivo wie auch des Transmigrationsversuches in vitro zeigen, dass die Behandlung mit dem Rezeptoragonisten wie erwartet den protektiven bzw. antiinflammatorischen Effekt von A_{2B}AR unterstützt, wohingegen die Behandlung mit dem Antagonisten keine signifikante Wirkung hat (vgl. Abb. 15). Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Es ist möglich, dass die Dosierung des Antagonisten nicht ausreichend war, obwohl diese Dosis zuvor von Eckle et al. verwendet wurde und folgend deutliche Ergebnisse zeigte. So ist die Überlebenszeit unter Beatmung bei Wildtypmäusen mit vorheriger Antagonist-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verkürzt. Im Unterschied zu dieser Arbeit wird in der Studie von Eckle et al. die Lungenschädigung durch mechanische Beatmung ausgelöst (Eckle et al. 2008b:3306).

Wie schon in den vorangegangenen Kapiteln erörtert, scheint es so, als ob die Wirkung von Adenosin über A_{2B}AR abhängig ist vom Auslöser der Lungenschädigung. Deswegen ist es denkbar, dass auch die Beeinflussung des Rezeptors durch einen Agonisten oder Antagonisten abhängig ist vom zugrunde liegenden Auslöser der Lungenschädigung.

Ein weiteres Schlüsselereignis ist die erhöhte Permeabilität und die Entwicklung eines Lungenödems. Deswegen wurde auch die Permeabilität der kapillär-alveolären Membranen unter Verwendung des A_{2B}AR-Agonisten BAY 60-6583 und des A_{2B}AR-Antagonisten PSB 1115 untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Reduktion der Permeabilität in Wildtypmäusen nach LPS-Gabe bei Verabreichung des Agonisten (vgl. Abb. 16). Dies unterstützt die Hypothese einer protektiven Rolle von A_{2B}AR. Die Behandlung mit dem Antagonisten erbrachte – wie auch zuvor in den Migrationsversuchen in vivo und den Transmigrationsversuchen in vitro – keinerlei Effekt.

Somit stellt die Behandlung mit einem A_{2B}AR-Agonisten eine vielversprechende Strategie in der Behandlung von ALI/ARDS dar, um eine überschießende Einwanderung neutrophiler Granulozyten ins Interstitium zu modellieren und damit der Zerstörung der Lungenarchitektur entgegenzuwirken. Des Weiteren wird

durch die Gabe eines Agonisten die Permeabilität der kapillär-alveolären Membranen reduziert und damit die Entstehung eines Lungenödems gehemmt. Zusätzlich konnte mittels der In-vitro-Transmigrationsversuche nochmals gezeigt werden, dass die Migration auch im In-vitro-Modell hauptsächlich durch $A_{2B}AR$ auf hämatopoetischen Zellen vermittelt wird. Bei der Behandlung der PMNs mit dem Agonisten migrierten signifikant weniger Zellen als bei einer Behandlung des Epithels oder Endothels. Zudem lässt sich feststellen, dass es nur bei Behandlung des Endothels mit dem Agonisten zu einer geringeren Migration kommt (vgl. Abb. 17). Dies zeigt sich auch in den In-vivo-Versuchen mit vorheriger Behandlung der Mäuse mit dem Agonisten. Es finden sich deutlich weniger PMNs im interstitiellen Raum im Vergleich zur Kontrollgruppe (vgl. Abb. 15, B, IS). Somit wird die transendotheliale Migration der PMNs bei Gabe des Agonisten deutlich abgeschwächt. Im Gegensatz dazu zeigt die Behandlung des Epithels mit dem Agonisten keine Auswirkungen auf die Migration der neutrophilen Granulozyten. Auch dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse der In-vivo-Versuche mit vorheriger Gabe des Agonisten. Eine Reduktion der transepithelialen Migration ist nicht zu erkennen (vgl. Abb. 15, C, BAL und Abb. 17). Somit ist entweder die Dichte von $A_{2B}AR$ auf Endothel und neutrophilen Granulozyten höher als auf Lungenepithel oder die $A_{2B}AR$ auf Lungenepithel sprechen auf eine Stimulation nicht an. Der größte Effekt lässt sich allerdings in der Gruppe nachweisen, in der sowohl die PMNs als auch das Endothel bzw. Epithel stimuliert werden.

Eine besondere Bedeutung kommt den Ergebnissen der In-vitro-Transmigrationsversuche zu, weil sie einen ersten Hinweis auf die Übertragbarkeit der zuvor gewonnenen Erkenntnisse aus den murinen In-vivo-Versuchen auf den Menschen geben.

4.4 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Dissertation dokumentieren eindeutig eine funktionelle Rolle von $A_{2B}AR$ in der Entstehung des *Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome*. Anhand der Versuche lässt sich für den akut inflammatorischen Prozess eine protektive Wirkung von extrazellulärem Adenosin über $A_{2B}AR$ belegen. Daraus resultiert eine verminderte Einwanderung neutrophiler

Granulozyten in das Lungeninterstitium und eine verminderte Permeabilität der alveolär-kapillären Membranen.

Der protektive Effekt von A_{2B}AR kann pharmakologisch mittels der Gabe eines A_{2B}AR-Agonisten sowohl im murinen In-vivo-Versuch als auch im humanen In-vitro-Versuch induziert werden und bietet daher neue Forschungsansätze für die Therapie von ALI/ARDS, zumal die gewonnenen Erkenntnisse auf eine Übertragbarkeit auf den Menschen schließen lassen.

Einen weiteren Forschungsansatz bietet die Frage, ob A_{2B}AR je nach Stimulus oder Applikation des Stimulus einen protektiven, profibrotischen oder proinflammatorischen Effekt vermittelt. Daraus könnte eine differenzierte pharmakologische Therapie abgeleitet werden.

Darüber hinaus ist das Zusammenspiel der vier unterschiedlichen Adenosinrezeptoren noch nicht hinreichend erforscht und bietet daher ebenfalls einen Forschungsansatz. Inwiefern sich die Adenosinrezeptoren untereinander beeinflussen, sich in ihrer Wirkung verstärken oder auch abschwächen, bleibt abzuwarten.

5 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AECC	<i>american-european consensus conference</i>
AK	Antikörper
ALI	<i>Acute Lung Injury</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
AR	Adenosinrezeptor
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
cAMP	zyklisches (<i>cyclic</i>) Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) Desoxyribonukleinsäure
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive lung disease</i>)
CRP	C-reaktives Protein
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflussszytometrie
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FP	Färbepuffer
FSC	<i>forward light scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
GAGs	Glykosaminoglykane
GZZ	Gesamtzellzahl
HE-Färbung	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös

Abkürzungsverzeichnis

ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i>
IL	Interleukin
IS	interstitieller Raum
IV	vaskulärer Raum
KC	<i>keratinocyte-derived chemokine</i>
KCLIP	<i>king county lung injury project</i>
KG	Körpergewicht
k.o.	Knock-out
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MIP-2	<i>macrophage inflammatory protein-2</i>
NFW	Nuklease-freies Wasser
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PGE ₂	Prostaglandin-E ₂
PGI ₂	Prostaglandin-I ₂ , Prostacyclin
PMN	<i>polymorphonuclear leukocyte</i>
RNA	<i>ribonucleinacid</i> , Ribonucleinsäure
rpm	<i>rates per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
VCAM	<i>vascular adhesion molecule</i>

Abkürzungsverzeichnis

ZZ

Zellzahl

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur des Lipopolysaccharids	11
Abbildung 2: Migration neutrophiler Granulozyten.....	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der PCR	32
Abbildung 4: Inhalationskammer zur LPS-Applikation.....	39
Abbildung 5: Pipettierschema der 24-well-Platte für den Transmigrationsversuch	52
Abbildung 6: Veränderung in der Transkription von $A_{2B}AR$	53
Abbildung 7: Lungenhistologie in HE-Färbung.	55
Abbildung 8: Lungenhistologie mit Immunhistochemie.....	55
Abbildung 9: Migration neutrophiler Granulozyten.....	57
Abbildung 10: Zeitverlauf der Migration von PMNs in die Lunge.	59
Abbildung 11: Migration neutrophiler Granulozyten in chimären Mäusen.	61
Abbildung 12: Einfluss von $A_{2B}AR$ auf die Permeabilität.	63
Abbildung 13: Einfluss von $A_{2B}AR$ auf die Permeabilität in chimären Mäusen.....	64
Abbildung 14: LPS-induzierte Zytokinproduktion.....	65
Abbildung 15: Einfluss des $A_{2B}AR$ -Agonisten BAY 60-6583 auf die Migration neutrophiler Granulozyten.....	67
Abbildung 16: Einfluss des $A_{2B}AR$ -Agonisten (BAY 60-6583) auf die Permeabilität.....	68
Abbildung 17: Transmigrationsversuch in vitro.....	71

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>American-European Consensus Conference</i> Diagnosekriterien für ALI und ARDS	7
Tabelle 2: Erkrankungen, die mit der Entwicklung von ALI/ARDS einhergehen.....	7
Tabelle 3: Biologische Funktionen der einzelnen Adenosinrezeptoren	20
Tabelle 4: Verdünnungsschema und Spezifität der Antikörper.....	43
Tabelle 5: Pipettierschema für Durchflusszytometrie	43
Tabelle 6: Differentialblutbild.	54

8 Literaturverzeichnis

- Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J. 2000. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(6):L1137-L1145.
- Abraham E. 2003. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 31(4):S195-S199.
- Acute respiratory distress syndrome network. 2000. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342(18):1301-1308.
- Adhikari NKJ, McAndrews MP, Tansey CM, Matté A, Pinto R, Cheung AM, Diaz-Granados N, Barr A, Herridge MS. 2009. Self-reported symptoms of depression and memory dysfunction in survivors of ARDS. *Chest* 135(3):678-687.
- Ashbough DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. 1967. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 290(7511):319-323.
- Atkins E. 1960. Pathogenesis of fever. *Physiol Rev* 40:580-646.
- Bachwich PR, Chensue SW, Larrick JW, Kunkel SL. 1986. Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E₂ production in resting macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 136(1):94-101.
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84:1045-1049.
- Basit A, Reutershan J, Morris MA, Solga M, Rose CE [Jr.], Ley K. 2006. ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (291):L200-L206.
- Beasley MB. 2010. The pathologist's approach to acute lung injury. *Arch Pathol Lab Med* 134:719-727.
- Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R, Consensus Committee. 1994. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149(3):818-824.
- Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J, The Australian and New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group. 2002. Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian states. *Am J Respir Crit Care Med* 165:443-448.

- Beutler B, Cerami A. 1989. The Biology of cachectin/TNF- a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7:625-655.
- Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. 1985. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 161(5):984-995.
- Blackburn MR. 2003. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-desaminase-deficient mice. *Trends Pharmacol Sci* 24(2):66-70.
- Borish LC, Steinke JW. 2003. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111:S460-S475.
- Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Romand JA, Villar J, Thorsteinsson A, Damas P, Armaganidis A, Lemaire F. 2004. Epidemiology and outcome of acute lung injury in european intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med* 30(1):51-61.
- Cagnina RE, Ramos SI, Marshall MA, Wang G, Frazier R, Linden J. 2009. Adenosine A_{2B} receptors are highly expressed on murine type II alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:L467-L474.
- Cannistra SA, Griffin JD. 1988. Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes. *Semin Hematol* 25(3):173-188.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(9):3666-3670.
- Cepkova M, Matthay MA. 2006. Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care Med* 21(3):119-143.
- Chignard M, Balloy V. 2000. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1083-L1090.
- Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG, Dejana E. 1996. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* 135(2):497-510.
- Dinarello CA, Wolff SM. 1993. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 328(2):106-113.
- Dinarello CA. 1988a. Biology of interleukin-1. *FASEB J* 2:108-115.
- Dinarello CA. 1988b. Interleukin-1. *Dig Dis Sci* 33(3):25S-35S.
- Doerschuk CM, Beyers N, Coxson HO, Wiggs B, Hogg JC. 1993. Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil seques-

- tration in the lung. *J Appl Physiol* 74(6):3040-3045.
- Downey GP, Doherty DE, Schwab III B, Elson EL, Henson PM, Worthen GS. 1990. Retention of leukocytes in capillaries: role of cell size and deformability. *J Appl Physiol* 69(5):1767-1778.
- Downey GP, Granton JT. 1997. Mechanism of acute lung injury. *Curr Opin Crit Care* 3:43-50.
- Drake JW, Crow JF. 1996. Recollections of Howard Temin (1934-1994). *Genetics* 144:1-6.
- Eckle T, Krahn T, Grenz A, Köhler D, Mittelbronn M, Ledent C, Jacobson MA, Osswald H, Thompson LF, Unertl K, Eltzschig HK. 2007. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A_{2B} adenosine receptors. *Circulation* 115:1581-1590.
- Eckle T, Faigle M, Grenz A, Laucher S, Thompson LF, Eltzschig HK. 2008a. A_{2B} adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. *Blood* 111(4):2024-2035.
- Eckle T, Grenz A, Laucher S, Eltzschig HK. 2008b. A_{2B} adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. *J Clin Invest* 118(10):3301-3315.
- Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K, Robson SC, Colgan SP. 2003. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A_{2B} receptors. *J Exp Med* 198(5):783-796.
- Eltzschig HK, Thompson LF, Karhausen J, Cotta RJ, Ibla JC, Robson SC, Colgan SP. 2004. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood* 104(13):3986-3992.
- Ely EW, Wheeler AP, Thompson BT, Ancukiewicz M, Steinberg KP, Bernard GR. 2002. Recovery rate and prognosis in older persons who develop acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 136(1):25-36.
- Engvall E, Jonsson K, Perlmann P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* 251:427-434.
- Engvall E, Perlmann P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874.
- Evans BAJ, Elford C, Pexa A, Francis K, Hughes AC, Deussen A, Ham J. 2006. Human osteoblast precursors produce extracellular adenosine, which modu-

- lates their secretion of IL-6 and osteoprotegerin. *J Bone Miner Res* 21(2): 228-236.
- Feoktistov I, Biaggioni I. 1995. Adenosine A_{2b} receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J Clin Invest* 96(4):1979-1986.
- Fiebich BL, Biber K, Gyufko K, Berger M, Bauer J, Van Calker D. 1996. Adenosine A_{2b} receptors mediate an increase in interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astrogloma cells. *J Neurochem* 66(4):1426-1431.
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. 2001a. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53(4):527-552.
- Fredholm BB, Irenius E, Kull B, Schulte G. 2001b. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol* 61(4):443-448.
- Fredholm BB. 2007. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 14:1315-1323.
- Furie MB, Tancinco MC, Smith CW. 1991. Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood* 78(8):2089-2097.
- Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA. 1985. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8667-8671.
- Garman RD, Jacobs KA, Clark SC, Raulet DH. 1987. 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 USA* 84(21):7629-7633.
- Goss CH, Brower RG, Hudson LD, Rubenfeld GD, ARDS Network. 2003. Incidence of acute lung injury in the United States. *Crit care Med* 31(6): 1607-1611.
- Grenz A, Osswald H, Eckle T, Yang D, Zhang H, Tran ZV, Klingel K, Ravid K, Eltzschig HK. 2008. The reno-vascular A_{2B} adenosine receptor protects the kidney from ischemia. *PLoS Med* 5(6):e137.
- Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 179:269-277.
- Hasko G, Cronstein BN. 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *TRENDS Immunol* 25(1):33-39.

- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265(3):621-636.
- Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, Matte-Martyn A, Diaz-Granados N, Al-Saidi F, Cooper AB, Guest CB, Mazer CD, Mehta S, Stewart TE, Barr A, Cook D, Slutsky AS. 2003. One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 348(8):683-693.
- Herzenberg Leonard A, Sweet RG, Herzenberg Leonore A. 1976. Fluorescence-activated cell sorting. This new technique, which is capable of identifying and isolating closely related types of animal cells at rates of up to 5 000 cells per second, holds much promise for investigations of cell biology. *Sci Am* 234:108-117.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Tsunasawa S, Sasakiyama F, Matsui H, Takahara Y, Taniguchi T, Kishimoto T. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324:73-76.
- Hofman P, D'Andrea L, Carnes D, Colgan SP, Madara JL. 1996. Intestinal epithelial cytoskeleton selectively constrains lumen-to-tissue migration of neutrophils. *Am J Physiol* 271: C312-C320.
- Holst O, Ulmer AJ, Brade H, Flad HD, Rietschel ET. 1996. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 16:83-104.
- Hopkins RO, Weaver LK, Collingridge D, Parkinson RB, Chan KJ, Orme Jr. JF. 2005. Two-year cognitive, emotional, and quality-of-life outcomes in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 171(4):340-347.
- Jeyaseelan S, Chu HW, Young SK, Worthen GS. 2004. Transcriptional profiling of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Infect Immun* 72(12):7247-7256.
- Keane MP, Strieter RM. 2000. Chemokine signaling in inflammation. *Crit Care Med* 28(4):N13-N26.
- Khoa ND, Montesinos MC, Williams AJ, Kelly M, Cronstein BN. 2003. Th1 cytokines regulate adenosine receptors and their downstream signaling elements in human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 171(8): 3991-3998.
- Kishimoto T. 1989. The Biology of Interleukin-6. *Blood* 74(1):1-10.
- Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, Waltersdorff AM. 1986. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 136(11):4220-4225.

- Kobzik L, Sholl L. 2009. Pulmonary pathology of ARDS: Diffuse alveolar damage. In: Choi A (Hrsg.) *Acute respiratory distress syndrome* In: Lenfant C (Hrsg) *Lung biology in health and disease*. New York, Informa Healthcare, 233(4):46-58.
- Kurdowska A, Noble JM, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, Martin TR. 2001. 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* 163(2): 463-468.
- Lawrence MB, Springer TA. 1993. Neutrophils roll on E-selektin. *J Immunol* 151(11):6338-6346.
- Lequin RM. 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 51(12):2415-2418.
- Libby P, Ordovas JM, Auger KR, Robbins AH, Birinyi LK, Dinarello CA. 1986. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am J Pathol* 124(2):179-185.
- Linden J. 2005. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Mol Pharmacol* 67(5):1385-1387.
- Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, Bonde J, ARF Study Group. 1999. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. *Am J Respir Crit Care Med* 159(6):1849-1861.
- MacCallum NS, Evans TW. 2005. Epidemiology of acute lung injury. *Curr Opin Crit Care* 11(1):43-49.
- MacNee W, Selby C. 1990. Neutrophils kinetics in the lungs. *Clin Sci* 79(2):97-107.
- Maris NA, de Vos AF, Dessing MC, Spek CA, Lutter R, Jansen HM, van der Zee JS, Bresser P, van der Poll T. 2005. Antiinflammatory effects of salmeterol after inhalation of lipopolysaccharide by healthy volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 172(7):878-884.
- Martin C, Leone M, Viviani X, Ayem ML, Guieu R. 2000. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit Care Med* 28(9):3198-3202.
- Meduri GU. 1996. The role of the host defence response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment. *Eur Respir J* 9(12):2650-2670.

- Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. 2002. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 100(12):3853-3860.
- Ming WJ, Bersani L, Mantovani A. 1987. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 138(5):1469-1474.
- Monchi M, Bellenfant F, Cariou A, Joly LM, Thebert D, Laurent I, Dhainaut JF, Brunet F. 1998. Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome: a multivariate analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 158(4):1076-1081.
- Moser B, Loetscher P. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2(2):123-128.
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51(3):263-273.
- Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262:56-65.
- Nash S, Stafford J, Madara JL. 1987. Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayer. *J Clin Invest* 80(4):1104-1113.
- Németh ZH, Leibovich SJ, Deitch EA, Vizi ES, Szabó C, Haskó G. 2003. cDNA microarray analysis reveals a nuclear factor- κ B-independent regulation of macrophage function by adenosine. *J Pharmacol Exp Ther* 306(3):1042-1049.
- Ngamsri KC, Wagner R, Vollmer I, Stark S, Reutershan J. 2010. Adenosine receptor A1 regulates polymorphonuclear cell trafficking and microvascular permeability in lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol* 185(7):4374-4384.
- Noma T, Mizuta T, Rosén A, Hirano T, Kishimoto T, Honjo T. 1987. Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines. *Immunol Lett* 15(3):249-253.
- Olson TS, Ley K. 2002. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(1):R7-R28.
- Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, toll-like receptor-4. *Immunology* 113(2):153-162.
- Parkos CA. 1997. Molecular events in neutrophil transepithelial migration. *BioEssays* 19(10):865-873.

- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57Bl/10ScCr mice: Mutations in Tlr 4 gene. *Science* 282(5396):2085-2088.
- Pratt PC, Vollmer RT, Shelburne JD, Crapo JD. 1979. Pulmonary morphology in a multihospital collaborative extracorporeal membrane oxygenation project. *Am J Pathol* 95(1):191-214.
- Raghavendran K, Pryhuber GS, Chess PR, Davidson BA, Knight PR, Notter RH. 2008. Pharmacotherapy of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Curr Med Chem* 15(9):1911-1924.
- Reutershan J, Basit A, Galkina EV, Ley K. 2005. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(5):L807-L815.
- Reutershan J, Morris MA, Burcin TL, Smith DF, Chang D, Saprito MS, Ley K. 2006. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest* 116(3):695-702.
- Reutershan J, Cagnina RE, Chang D, Linden J, Ley K. 2007. Therapeutic anti-inflammatory effects of myloid cell adenosine receptor A2a stimulation in lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol* 179(2):1254-1263.
- Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri KC, Eltzschig HK. 2009. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB J* 23(2):473-482.
- Rothe G. 2007. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G (Hrsg). *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel, Karger, 27-70.
- Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. 2005. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 353:1685-1693.
- Ryzhov S, Goldstein AE, Matafonov A, Zeng D, Biaggioni I, Feoktistov I. 2004. Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A_{2B}-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma. *J Immunol* 172(12):7726-7733.
- Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Novitskiy SV, Blackburn MR, Biaggioni I, Feoktistov I. 2008. Effect of A2B adenosine receptor gene ablation on Adenosine-dependent regulation of proinflammatory cytokines. *JPET* 324(2):694-700.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a ther-

- mostable DNA polymerase. *Science* 239(4839):487-491.
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslet C. 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14(3):131-136.
- Schepp CP, Reutershan J. 2008. Bench-to bedside-review: adenosine receptors – promising targets in acute lung injury. *Crit Care* 12(5):226-233.
- Schingnitz U, Hartmann K, MacManus CF, Eckle T, Zug S, Colgan SP, Eltzschig HK. 2010. Signaling through the A_{2B} Adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury. *J Immunol* 184(9):5271-5279.
- Sitaraman SV, Merlin D, Wang L, Wong M, Gewirtz AT, Si-Tahar M, Madara JL. 2001. Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J Clin Invest* 107(7):861-869.
- Sligh JE [Jr.], Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL. 1993. Inflammatory and immune response are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(18):8529-8533.
- Smith JA. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56(6):672-686.
- Sun CX, Zhong H, Mohesenin A, Morschl E, Chunn JL, Molina JG, Belardinelli L, Zeng D, Blackburn MR. 2006. Role of A_{2B} adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J Clin Invest* 116(8):2173-2182.
- Technische Universität Graz, Institute of analytical chemistry (Hrsg.). 2012. Fluorophores.org – Database of Fluorescent Dyes and Applications. Graz. Internet: <http://www.fluorophores.tugraz.at>. Zugriff am 22.05.2012.
- Thorn J. 2001. The inflammatory response in humans after inhalation of bacterial endotoxin: a review. *Inflamm Res* 50(5):254-261.
- Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. 1987. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 33:662-664.
- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. 1978. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 31(6):507-520.
- Wagner R, Ngamsri KC, Stark S, Vollmer I, Reutershan J. 2010. Adenosine receptor A₃ is a critical mediator in LPS-induced pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299(4):L502-L512.
- Wakai A, Wang JH, Winter DC, Street JT, O'Sullivan RG, Redmond HP. 2001. Adenosine inhibits neutrophil vascular endothelial growth factor release and

- transendothelial migration via A_{2B} receptor activation. *Shock* 15(4):297-301.
- Ware LB, Matthay MA. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342(18):1334-1349.
- Ware LB, Matthay MA. 2001. 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* 163(6):1376-1383.
- Ware LB. 2006. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 27(4):337-349.
- Wheeler AP, Bernard GR. 2007. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet* 369(9572):1553-1564.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80(5):617-653.
- Xaus J, Mirabet M, Lloberas J, Soler C, Lluís C, Franco R, Celada A. 1999. IFN- γ up-regulates the A_{2B} adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J Immunol* 162(6):3607-3614.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. 1998. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101(2):311-320.
- Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, Koupenova M, Chauhan AK, Makitalo M, Jones MR, St. Hilaire C, Seldin DC, Toselli P, Lamperti E, Schreiber BM, Gavras H, Wagner DD, Ravid K. 2006. The A_{2B} adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *J Clin Invest* 116(7):1913-1923.
- Yang D, Koupenova M, McCrann DJ, Kopeikina KJ, Kagan HM, Schreiber BM, Ravid K. 2008. The A_{2b} adenosine receptor protects against vascular injury. *PNAS* 105(2):792-796.
- Zemans RL, Colgan SP, Downey GP. 2009. Transepithelial migration of neutrophils. Mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40(5):519-535.
- Zhong H, Belardinelli L, Maa T, Feoktistov I, Biaggioni I, Zeng D. 2004. A_{2B} adenosine receptors increase cytokine release by bronchial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(1):118-125.
- Zhou Y, Schneider DJ, Morschl E, Song L, Pedroza M, Karmouty-Quintana H, Le T, Sun CX, Blackburn MR. 2011. Distinct roles for the A_{2B} adenosine receptor in acute and chronic stages of bleomycin-induced lung injury. *J Immunol* 186(2):1097-1106.

Literaturverzeichnis

Zlotnik A, Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127.