

Anti-inflammatorische Effekte von Fibraten in murinen Alveolarepithelzellen Typ II

Aniella Katharina Behnk

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



Wissenschaften sind unser Leben
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Anti-inflammatorische Effekte von Fibraten in murinen Alveolarepithelzellen Typ II

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Aniella Katharina Behnk

aus Gießen

Gießen 2014

Aus dem
Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg (UKGM) GmbH,
Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. K. Mayer
Gutachter: Prof. Dr. S. Rohrbach

Tag der Disputation: 27.10.2014

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	2
1.1 Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)	2
1.1.1 Definition.....	2
1.1.2 Entstehung	2
1.1.3 Pathophysiologie.....	3
1.1.4 Behandlung.....	4
1.2 Die pulmonale Alveole	4
1.2.1 Anatomie der Alveole	4
1.2.2 Alveolarepithelzellen (AEC) Typ II.....	5
1.3 LPS-vermittelte Entzündungsreaktion	7
1.3.1 Lipopolysaccharid (LPS).....	7
1.3.2 Nuclear Factor κ B (NF- κ B).....	7
1.4 Cyclooxygenase (COX)	9
1.4.1 Funktion und Expression.....	9
1.4.2 Produkte der COX.....	9
1.4.2.1 Prostaglandine	10
1.4.2.1.1 Prostaglandin (PG) E ₂	10
1.4.2.2 Thromboxan.....	11
1.5 Zytokine	12
1.5.1 Tumor Nekrose Faktor (TNF)	12
1.5.2 Makrophagen inflammatorisches Protein (MIP)-2	13
1.6 Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)	13
1.6.1 Grundlagen	13
1.6.2 Signalweg	14
1.7 PPAR α	15
1.7.1 Wirkung.....	15
1.7.2 Liganden des PPAR α	16
1.7.3 PPAR α in der Lunge.....	16
1.8 Fragestellung	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	18
2.2 Material	18
2.2.1 Materialien für die Tierhaltung.....	18
2.2.2 Chemikalien, Materialien und Geräte für die Zellisolation.....	18
2.2.2.1 Chemikalien	18
2.2.2.2 Materialien	20
2.2.2.3 Geräte.....	22
2.2.3 Chemikalien, Materialien und Geräte für die <i>in vitro</i> Bestimmung	23
2.2.3.1 Chemikalien	23
2.2.3.2 Materialien	28
2.2.3.3 Geräte.....	29
2.3 Methoden.....	30
2.3.1 Isolation und Kultivierung von Alveolarepithelzellen Typ II (AEC II)	30
2.3.1.1 Zellisolation	30
2.3.1.2 Kultivierung der AEC II.....	31
2.3.1.3 Abstoppen des Versuchs.....	31
2.3.2 Proteinbestimmung	32
2.3.3 Western Blot (Gelelektrophorese)	32
2.3.4 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	33
2.3.4.1 TNF- α / MIP-2 (Sandwich-Methode)	33
2.3.4.2 PGE ₂ (kompetitive Methode).....	34
2.3.4.3 TxB ₂ (kompetitive Methode)	35
2.3.5 RT(Real-time)-PCR	35
2.3.5.1 RNA-Isolation.....	35
2.3.5.2 c-DNA-Synthese	35
2.3.5.3 Real-time PCR (polymerase chain reaction)	36
2.4 Protokoll der Experimente	37
2.4.1 Gruppeneinteilung.....	37
2.4.2 Zeitverlauf	38
2.5 Statistik.....	38
3. ERGEBNISSE.....	39
3.1 Tierzahlen.....	39
3.2 Entzündungsreaktion in AEC II	39

3.2.1 LPS-Stimulation steigert die Expression proinflammatorischer Parameter in AEC II.....	39
3.3 Effekte von WY 14,643 in AEC II.....	45
3.3.1 WY 14,643 hat keinen signifikanten Einfluss auf die COX-2-Expression in AEC II.....	45
3.3.2 WY 14,643 hat keinen nachweisbaren Effekt auf die PGE ₂ -Produktion in AEC II.....	50
3.3.3 WY 14,643 vermindert in stimulierten AEC II bei <i>in vivo</i> -Behandlung den Anstieg der TxB ₂ -Produktion.....	52
3.3.4 WY 14,643 vermindert in AEC II bei <i>in vivo</i> -Behandlung die Produktion proinflammatorischer Zytokine.....	54
3.3.4.1 TNF- α	54
3.3.4.2 MIP-2.....	56
3.4 PPAR α -Expression in der Gesamtlunge und in isolierten AEC II.....	58
4. DISKUSSION.....	60
4.1 Alveolarepithelzellen (AEC) Typ II im ARDS.....	60
4.2 Entzündungsreaktion in AEC II.....	62
4.3 Fibrate in Lungenerkrankungen.....	65
4.4 Effekte von Fibraten in AEC II.....	65
4.5 Fazit und Ausblick.....	69
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	71
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	73
7. ANHANG.....	84
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	84
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	88
7.3 Tabellenverzeichnis.....	88
7.4 Erklärung.....	89
7.5 Danksagung.....	90
7.6 Lebenslauf.....	91
7.7 Publikationen und Vorträge.....	92

1. EINLEITUNG

1.1 Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

1.1.1 Definition

Das akute Lungenversagen (*acute respiratory distress syndrome* = ARDS) gehört zu den häufigsten Ursachen für das Versterben von Patienten auf Intensivstationen. Erstmals wurde es 1967 beschrieben (Ashbaugh DG 1967) und wird definiert durch das plötzliche Eintreten einer Hypoxämie (Oxygenierungsrate ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ Ratio) von ≤ 200), diffuse bilaterale Infiltrate im Thorax-Röntgenbild und einem pulmonalarteriellen Druck (Wedge-Druck) ≤ 18 mmHg. Durch die Oxygenierungsrate war das ARDS bisher abzugrenzen vom ALI (*acute lung injury*), welches sich über eine $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ Ratio von ≤ 300 definiert und durch einen etwas milderen Verlauf gekennzeichnet ist (Bernard GR 1994, Artigas et al. 1998).

In 2012 wurde mit der „Berlin definition“ eine neue Einteilung des ARDS in drei Stadien empfohlen: *mild* ($200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$), *moderate* ($100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$) und *severe* ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100 \text{ mmHg}$). Durch die neue und genauere Definition sollen validere Voraussagen bzgl. der Mortalität bei ARDS ermöglicht werden (The ARDS Definition Task Force* 2012).

Die Mortalität unter Patienten mit ARDS lag in den auf die Erstbeschreibung folgenden Jahren bei 50 – 70 % (Bernard et al. 1997). Auch in aktuelleren Studien wurde sie zuletzt fast unverändert hoch mit 30-60 % beziffert (Brun-Buisson et al. 2004, Rubenfeld et al. 2005).

1.1.2 Entstehung

Der pathophysiologische Ursprung bei der Entstehung des ARDS ist eine unspezifische Reaktion auf unterschiedlichste pulmonale Schädigungen. Diese können auf direkte (intrapulmonale) oder indirekte (extrapulmonale) Weise verursacht werden. Zu den direkten Ursachen zählen u.a. Pneumonien (bakteriell, viral oder fungal), Aspiration von Magensäure/-inhalt, traumatische Thorax- und/oder Lungenkontusion, Inhalation von Rauch und/oder Gasen, Fettembolien sowie das Reperfusionsödem nach

Einleitung

Lungentransplantation. Die indirekten Ursachen umfassen die schwere Sepsis (als insgesamt häufigste Ursache des ARDS), multiple Transfusionen, Schock, Pankreatitis, Drogenintoxikation, schweres Polytrauma (auch ohne unmittelbare thorakale Schädigung) und die DIC (*disseminated intravasal coagulation* = disseminierte intravasale Gerinnung) (Hecker et al. 2008).

Verschiedene Faktoren können darüber hinaus als Prädiktoren für einen schweren Verlauf des ARDS gelten. Dazu gehören ein hohes Alter des Patienten, nicht-pulmonale Organdysfunktionen, verminderte Immunkompetenz, Azidose (Blut-pH < 7,30), Leberzirrhose, maligne Tumoren oder das gleichzeitige Vorliegen eines septischen Schocks (Brun-Buisson et al. 2004).

Zu den letalen Verläufen des ARDS kommt es häufig durch assoziierte septische Komplikationen, wie u.a. eine durch gramnegative Erreger verursachte Pneumonie (durch z.B. *Pseudomonas aeruginosa* oder *Klebsiella pneumoniae*), Lungenabszesse oder die generalisierte Sepsis mit folgendem multiplen Organversagen (Petty and Ashbaugh 1971).

1.1.3 Pathophysiologie

Durch die Schädigung des pulmonalen Parenchyms kommt es in der Lunge in Folge von endothelialer und epithelialer Schädigung zu einer Störung in der alveolärkapillären-Barriere und damit zu einer erhöhten Membranpermeabilität mit kapillärer Leakage. Dies hat zum Einen den Austritt von Flüssigkeit in die Alveolen bei gleichzeitig verminderter zellulärer Rückresorptionskapazität (alveoläres Ödem), zum Anderen eine Verminderung der Surfactant-Aktivität an der Alveolenoberfläche und die Entstehung von Atelektasen (Kollaps der Alveolen) zur Folge. Darüber hinaus kommt es zur Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Die Konsequenzen sind ein verminderter Gasaustausch mit erhöhtem Shuntvolumen und eine verminderte Dehnungsfähigkeit (Compliance) der Lunge mit konsekutiv erhöhter Atemarbeit (Pfeifer 2010, Ware und Matthay 2000).

Beim Patienten zeigt sich dies klinisch zunächst durch eine refraktäre Hypoxämie mit daraus resultierender Tachypnoe und Zyanose. Im Verlauf resultiert daraus häufig eine Beatmungs- und Intensivpflichtigkeit (Petty und Ashbaugh 1971).

1.1.4 Behandlung

Die bisherige Behandlung des ARDS fokussiert sich vor allem auf konservative Maßnahmen, da die Wirkung gezielter pharmakologischer Therapien bislang nicht durch klinische Studien belegt werden konnte.

Am erfolgversprechendsten erschien eine Zeit lang die Administration von inhalativem Surfactant (Lewis and Jobe 1993, Seeger et al. 1993), welche sich jedoch in den folgenden klinischen Studien nicht der konservativen Therapie überlegen darstellen konnte (Anzueto et al. 1996, Kesecioglu and Haitzma 2006).

Zu den aktuell angewandten konservativen Therapiemaßnahmen zählen eine lungenschonende Beatmung (druckkontrolliert mit niedrigen Tidalvolumina), Anlegen eines positiven endexpiratorischen Beatmungsdrucks (*positive endexpiratory pressure* = PEEP), permissive Hyperkapnie und Flüssigkeitsrestriktion mit gegebenenfalls forcierter Diurese (Lunn and Murray 1998). Darüber hinaus empfehlen sich die Anpassung der parenteralen Ernährung (Mayer et al. 2003), eine suffiziente Analgesie und Anxiolyse des beatmeten Patienten sowie die Vermeidung von kritischen Komplikationen wie z.B. einer Sekundärinfektion, gastraler Ulzera mit Blutung oder Thrombembolien (Hecker et al. 2008). Als Ultima ratio besteht die Möglichkeit zur temporären Anlage einer ECMO (*extracorporeal membrane oxygenation*). Die Daten aus einigen Studien deuten hier auf eine verbesserte Überlebensrate der behandelten Patienten hin (Müller et al. 2013, Peek et al. 2009).

1.2 Die pulmonale Alveole

1.2.1 Anatomie der Alveole

Die Alveole (= Lungenbläschen) bildet die terminale Einheit des Bronchialbaums der Lunge. Nachdem sich die Trachea nach aboral zunächst in den rechten und linken Hauptbronchus, dann in die Bronchiolen und schließlich in die *Bronchioli terminales* aufgezweigt hat, besteht der daran anschließende Azinus aus dem Alveolengang (*Ductus alveolaris*) mit an dessen Ende traubenförmig angeordneten einzelnen Alveolen, in welchen der Gasaustausch stattfindet (siehe Abb.1).

Bei den die Alveole vordergründig auskleidenden Zellen lassen sich zwei morphologisch und funktionell verschiedene Zelltypen unterscheiden, die Alveolarepithelzelle Typ I (AEC I) und Typ II (AEC II). Dabei sind die AEC I vom

Einleitung

squamösen (plattenepithelialen) Zelltyp und machen etwa 95% der Zellpopulation aus, während die kuboidalen AEC II die restlichen 5% darstellen (Evans et al. 1973). Im alveolären Interstitium befinden sich noch weitere Zellen, wie Alveolarmakrophagen, Mastzellen, Myofibroblasten und dendritische Zellen.

Der Gasaustausch wird durch ein dichtes Blutkapillarenetz um die Alveole ermöglicht. Über die ephtheliale-endothliale Barriere findet dann die Diffusion von O₂ und CO₂ statt.

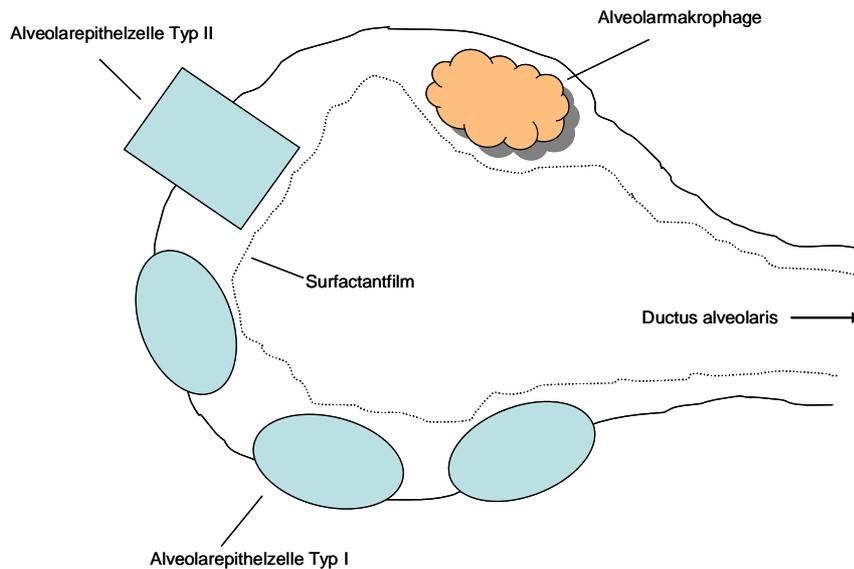


Abb. 1: Die pulmonale Alveole

1.2.2 Alveolarepithelzellen (AEC) Typ II

Die AEC II hat verschiedene, für die Funktion und Regenerationsfähigkeit des Lungengewebes wichtige Aufgaben. So produziert sie das oberflächenaktive Surfactant (von *surface active protein*), welches 1954 erstmals von Macklin beschrieben wurde (Macklin 1954). Es besteht zu 90% aus Phospholipiden und zu 10% aus Proteinen. Der Proteinanteil setzt sich dabei wiederum aus vier verschiedenen Proteintypen zusammen, SP-A, -B, -C und -D. Das SP-C ist spezifisch für die AEC II, während die anderen Typen auch z.B. von Clarazellen (= spezialisierte sekretorische Zellen der distalen Atemwege) produziert werden (Kalina et al. 1992, Beers 1994). Die Surfactantsynthese erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat der AEC II. Bis zur Sekretion wird das Surfactant in lamellären Einschlusskörperchen (*lamellar bodies*) der AEC II gespeichert. Nach Exkretion durch die apikale Zellmembran kleidet es als

Einleitung

dünnen Film die Oberfläche des alveolären Epithels aus und reduziert dort die Oberflächenspannung. So ermöglicht es eine verminderte Atemarbeit und ein Kollaps der Alveole (Atelektase) in der Expiration wird verhindert (Phizackerley et al. 1979). Darüber hinaus trägt das Surfactant zur Erhaltung der alveolären Flüssigkeitshomöostase und zur Verhinderung eines alveolären Ödems bei, indem es durch seine lipophilen Eigenschaften eine vermehrte Transsudation von Flüssigkeit aus dem Interstitium in das alveoläre Lumen verhindert (Macklin 1954). Auch immunologisch ist das Vorhandensein von Surfactant für die Integrität der Lunge von Bedeutung: bestimmten Bestandteilen des Surfactants ist eine Beteiligung an der Bekämpfung von pathogenen Keimen nachgewiesen. So können z.B. SP-A und SP-D als Opsonine oder als Stimulatoren der Chemotaxis auf alveoläre Makrophagen wirken und so die pulmonale Abwehrreaktion unterstützen (Pison U 1994).

Die AEC II selbst erfüllt eine wichtige Rolle als Stammzelle des alveolären Epithels und gewährleistet durch Teilung und Proliferation eine kontinuierliche Erneuerung des Gewebes (Fehrenbach 2001). Sowohl im regulären Zellzyklus als auch reaktiv, z.B. als Folge einer ALI, ist sie in der Lage, AEC I und AEC II kontinuierlich zu ersetzen (Uhal 1997). Dabei scheinen verschiedene Botenstoffe, wie z.B. KGF (keratinocyte growth factor), die Proliferation der AEC II zu fördern (Ulich et al. 1994), darüber hinaus kann diese auch durch Zell-Zell-Interaktionen (wie z.B. mit Fibroblasten) beeinflusst werden (Adamson et al. 1990).

Auch an immunologischen Prozessen des Lungengewebes scheinen die AEC II beteiligt zu sein. So ist einerseits das produzierte Surfactant relevant für die Abwehrfunktion des Epithels (s.o.), andererseits sind die AEC II selbst in der Lage, auf spezifische Stimuli, wie z.B. Hypoxie, bestimmte Chemokine (MCP (*monocyte chemoattractant protein*)-1, RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*)) und Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) zu produzieren und so auf das immunologische Geschehen Einfluss zu nehmen (Rosseau et al. 2000, Kang et al. 1993).

Über eine Na^+/K^+ -ATPase sind die AEC II fähig zum aktiven Transport von Natrium von der apikalen zur basalen Zelloberfläche und stellen damit den Hauptfaktor zur Entfernung von Flüssigkeit aus dem alveolären Raum dar (Mason et al. 1982, Matthay et al. 1996).

1.3 LPS-vermittelte Entzündungsreaktion

1.3.1 Lipopolysaccharid (LPS)

LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Beim Zerfall dieser Bakterien wird LPS freigesetzt und wirkt dann im befallenen Organismus als Endotoxin pro-inflammatorisch auf verschiedene Zellen: in Monozyten führt es zur Zytokin-, Komplementfaktoren- und *tissue factor*-Synthese, es fördert die Proliferation und IgG-Produktion von B-Lymphozyten und bewirkt die Aktivierung neutrophiler Granulozyten (Schumann 1992). Diese Wirkungen entwickeln sich über einen mehrstufigen Signalweg: Das lösliche LPS im Blut ist an LBP (*LPS-binding-protein*) gebunden, ein in den Hepatozyten synthetisiertes Glykoprotein, welches in der frühen Phase der Entzündungsreaktion als Akute-Phase-Protein vermehrt synthetisiert und ausgeschüttet wird (Ulevitch und Tobias 1995, Mukaida et al. 1996). Der LPS/LBP-Komplex kann dann an CD14-Rezeptoren binden, welche als Oberflächenantigene v.a. auf Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und Endothelzellen exprimiert werden (Wright et al. 1990). CD14 selbst besitzt keine Transmembrandomäne, sondern aktiviert nach Bindung des LPS/LBP-Komplexes den TLR (*Toll-like-receptor*)-4, über welchen dann die Signalkaskade nach intrazellulär vermittelt wird (Takeuchi et al. 1999). Dies führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor* κ B) und in Folge zur Transkription pro-inflammatorischer Zielgene (Mukaida et al. 1996).

1.3.2 Nuclear Factor κ B (NF- κ B)

Zur NF- κ B-Familie gehören fünf Transkriptionsfaktoren, RelA (p65), RelB, c-Rel, NF κ B1 (p50/p105) und NF κ B2 (p52/p100). Sie alle sind (bis auf Rel-B) in der Lage, miteinander Homo- oder Heterodimere zu bilden, wobei die häufigste Form ein Heterodimer aus p50- oder p52-Untereinheiten mit einer p65-Untereinheit darstellt (Tak and Firestein 2001). Alle Mitglieder der NF- κ B-Familie spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem und in der Entzündungsreaktion, aber auch in der Regulation von Proliferation und Überleben von Zellen. Ihre Aktivität kann durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli, wie z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren und virale oder bakterielle Infektionen, beeinflusst werden. In unstimulierten Zellen sind die NF- κ B-Proteine an inhibitorische I κ B (*inhibitors of* κ B)-Proteine gebunden (I κ B α , β , oder ϵ) und liegen so inaktiv im Zytosol vor. Durch einen geeigneten Stimulus (z.B. LPS- oder TNF- α -Rezeptoraktivierung) kommt es zur Aktivierung spezifischer I κ B-Kinasen

Einleitung

(IKK), was zur Phosphorylierung, Ubiquitinierung und anschließend zur Degradierung des I κ B durch ein Proteasom führt. Dadurch wird NF- κ B freigesetzt und transloziert in den Nukleus, wo es dann, mit Hilfe von Coaktivatoren, die Transkription von Zielgenen beeinflussen kann (Cooper 2000, Alberts 2002). Zu diesen gehören u.a. die Gene für die Zytokine TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)- α , IL (Interleukin)-1 β , -6 und -8, wie auch Gene der COX (Cyclooxygenase)-2 (Tak and Firestein 2001). Im Gegensatz dazu sind anti-inflammatorische Mechanismen bekannt, welche ihre Wirkung über eine Inhibierung des NF- κ B-Signalweges entwickeln. Dazu gehört z.B. der PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*, s.u.) α , welcher bei Aktivierung u.a. über eine Steigerung der I κ B α -Expression und daraus resultierende vermehrte zytosolische Bindung von NF- κ B eine verminderte Fortleitung pro-inflammatorischer Signale bewirkt (Delerive *et al.* 2000) (Abb. 2).

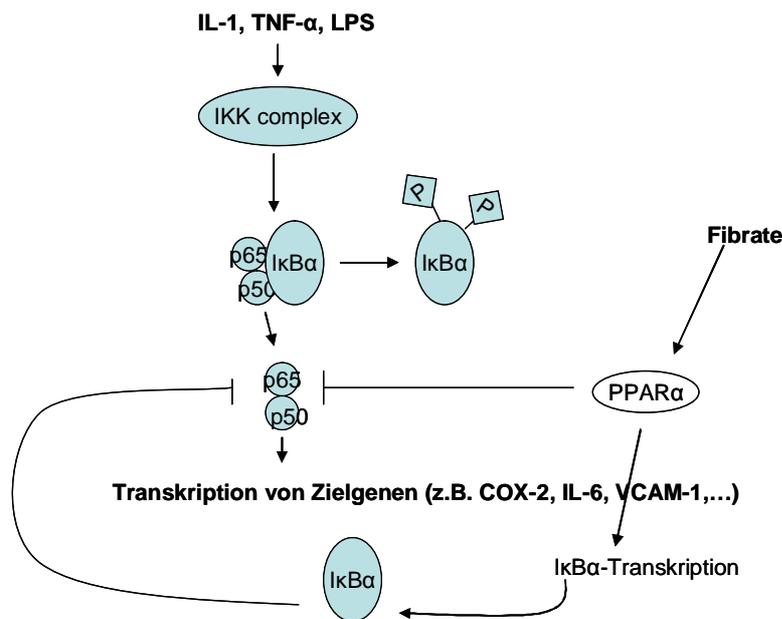


Abb. 2: Modell des NF- κ B-Signalwegs mit Darstellung des inhibitorischen Effekts durch PPAR α -Aktivierung

1.4 Cyclooxygenase (COX)

1.4.1 Funktion und Expression

Die COX katalysiert als zelluläres Enzym die Konversion von Arachidonsäure zu den pro-inflammatorischen Eicosanoiden Prostaglandin (PG) G_2 und H_2 . Dieser Mechanismus wurde erstmals 1971 von Vane beschrieben und lieferte damals die Erklärung zur Wirkungsweise der zu diesem Zeitpunkt schon verbreitet therapeutisch eingesetzten Acetylsalicylsäure, bekannt auch als Wirkstoff im Aspirin®. Diese (und andere Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR)) fungiert als Hemmstoff der COX und kann so eine Verminderung der Eicosanoid-Synthese und damit eine Verminderung der Entzündungsreaktion im Körper bewirken (Vane 1971). Das benötigte Substrat, die Arachidonsäure, wird durch die Phospholipase A_2 aus den Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt. Das von der COX in einer Oxygenasereaktion synthetisierte PGG_2 wird durch eine darauffolgende Peroxidasereaktion zunächst in PGH_2 und dann durch weitere enzymatische Schritte mit Hilfe von Synthasen in die verschiedenen Eicosanoide umgewandelt (Dubois et al. 1998).

Seit 1991 ist bekannt, dass zwei primäre Isoformen der COX existieren, COX-1 und -2 (Kujubu et al. 1991). Während die COX-1 in den meisten Geweben kontinuierlich exprimiert wird, ist die Expression der COX-2 durch inflammatorische Stimuli, wie z.B. IL-1, TNF- α , LPS etc., induzierbar (Crofford 1997). Andererseits lässt sich die Expression der COX-2 durch u.a. Glukokortikoide senken (Masferrer et al. 1994). Das COX-2-Gen besitzt für seine Regulation eine Vielzahl möglicher Regulationsstellen, z.B. *cAMP (cyclic Adenosin Monophosphat) responsive element*, *IL-6 responsive element*, *nF- κ B responsive element* etc. (Wu 1995). Als COX-3 ist eine *splicing*-Variante der COX-1 bekannt, welche in einigen neuronalen Zellen exprimiert wird (Chandrasekharan et al. 2002).

1.4.2 Produkte der COX

Wie oben erwähnt entstehen durch die enzymatische Aktivität der COX die Eicosanoide, auch Prostanoiden genannt. Zu ihnen zählen Prostaglandine (PG), Prostazyklin (PGI) und Thromboxane (Tx). Sie alle werden aus den Vorstufen PGG_2 und PGH_2 synthetisiert. Nach ihrer Synthese sind die Eicosanoide nur für kurze Zeit stabil und entfalten ihre Wirkung als Signalmoleküle daher vorwiegend lokal über

Einleitung

autokrine oder parakrine Signalwege. Dabei können sie, nach Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf der Zelloberfläche, in ihren Zielzellen verschiedene Reaktionen auslösen, wie z.B. Aggregation (in Thrombozyten), Kontraktion (in glatten Muskelzellen) oder Entzündung (Mitchell und Warner 1999, Cooper 2000).

Die Metaboliten der COX besitzen eine Vielzahl sowohl physiologischer als auch pathophysiologischer Effekte und sind in verschiedene Homöostasekreisläufe des Organismus eingebunden. Die von der COX-1 kontinuierlich synthetisierten Prostanoiden tragen dabei u.a. zur Regulation der Nieren- und Thrombozytenfunktion sowie zum Schutz der gastralen Mukosa bei (Smith et al. 1996). So erklärt sich, warum die systemische Hemmung der COX-1 durch NSAR in den Nieren und im Gastrointestinaltrakt zu unerwünschten Nebenwirkungen und Funktionsverlusten (Nierenversagen, gastrale Ulzera) führen kann. Ihre Hemmung in den Thrombozyten ist dagegen bei z.B. der Sekundärprävention von kardiovaskulären Erkrankungen durchaus erwünscht. Bei erhöhter Expression von COX-2 im Rahmen einer lokalen oder systemischen Entzündung führen die entstehenden Metaboliten zur Verstärkung der Entzündungsreaktion, welche durch lokalen Schmerz und Schwellung sichtbar werden kann. Diese Effekte lassen sich durch systemische oder auch lokale Gabe von NSAR ebenfalls erfolgreich bekämpfen (Mitchell und Warner 1999).

1.4.2.1 Prostaglandine

Es werden vier biologisch aktive Formen des Prostaglandins unterschieden: Prostaglandin E₂ (PGE₂), Prostaglandin I₂ (PGI₂), Prostaglandin D₂ (PGD₂) und Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}). Sie alle werden durch spezifische Prostaglandinsynthasen aus der Vorstufe PGH₂ produziert. Während im gesunden Organismus nur geringe Mengen PGs produziert werden, kommt es in der Frühphase einer Entzündungsreaktion zu einer deutlichen Veränderung von Menge und Profil der PGs. Ihre Wirkung vermitteln die PGs über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche sich für jede PG-Unterart unterscheiden (Ricciotti und FitzGerald 2011).

1.4.2.1.1 Prostaglandin (PG) E₂

PGE₂ gehört zu den im Organismus vorherrschenden Prostaglandinen und verfügt über vielfältige biologische Aktivität. Seine Synthese aus PGH₂ erfolgt durch die Isomerase-Reaktion drei verschiedener PGE-Synthasen (PGES): *cytosolic PGE synthase* (cPGES) und *membrane PGE synthase* (mPGES)-1 und -2. Während cPGES

Einleitung

und mPGES-2 konstitutiv exprimiert werden, ist die mPGES-1, ähnlich wie die COX-2, durch inflammatorische Stimuli induzierbar (Samuelsson et al. 2007). Die Wirkung von PGE₂ wird über die zellulären Prostaglandinrezeptoren EP (*E prostanoid receptor*) 1-4 vermittelt. Sein Abbau erfolgt durch die 15-PGDH (15-Prostaglandin-Dehydrogenase), deren Expression z.B. durch pro-inflammatorische Zytokine (TNF α , IL-1 β) reduziert und durch anti-inflammatorische Zytokine oder Glukokortikoide gesteigert werden kann (Xun et al. 1991, Pomini et al. 1999). Unter physiologischen Bedingungen ist PGE₂ an vielen biologischen Prozessen, wie der Regulation der Immunantwort, des Blutdrucks, der gastrointestinalen Integrität und der Fertilität beteiligt. Eine Dysregulation der PGE₂-Synthese geht daher mit schweren pathologischen Folgen einher, wie etwa der Entwicklung von chronischen Entzündungen, Alzheimer oder auch Karzinogenese (Legler et al. 2010). Wenn PGE₂ während einer lokalen Entzündungsreaktion von Zellen ausgeschüttet wird, so führt dies zu Vasodilatation und erhöhter postkapillärer Gefäßpermeabilität, was sich in lokaler Rötung (Erythem) und Schwellung (Ödem) manifestiert.

PGs, und vor allem PGE₂, erzeugen bei einer Entzündungsreaktion eine Sensibilisierung der Schmerzrezeptoren und damit eine lokale Hyperalgesie. Zentral wirken sie über EP-3-Rezeptoren auf Temperatur-sensible Neurone im Hypothalamus, wodurch sich die febrile Reaktion im Rahmen einer generalisierten Entzündung und umgekehrt der starke antipyretische Effekt von NSARs erklärt (Funk 2001). PGE₂ ist über einen *feedback*-Mechanismus auch in der Lage, bei einer Entzündungsreaktion die Expression der COX-2 hochzuregulieren und damit seine eigene Produktion zu fördern (Hinz und Brune 2002).

1.4.2.2 Thromboxan

Thromboxan wird vor allem in Thrombozyten über die COX-1 und eine nachfolgende Thromboxan-Synthase produziert. Dabei entsteht aus der Vorstufe PGH₂ zunächst das instabile Thromboxan A₂ (TxA₂), welches bereits nach 30 Sekunden nicht-enzymatisch in das biologisch inaktive Thromboxan B₂ (TxB₂) umgewandelt wird. TxA₂ spielt als Mediator der Plättchenaggregation für die Funktion der Blutplättchen und die Homöostase der Blutgerinnung eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus kann es eine Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und damit einhergehende Vasokonstriktion bewirken. Seine Wirkung wird dabei über den TP (*thromboxan prostanoid*)-Rezeptor vermittelt (Funk und FitzGerald 2007). In der septischen Lunge

kann TxA_2 auf diesem Weg eine Steigerung des pulmonalarteriellen Drucks bewirken (Seeger und Lasch 1987).

1.5 Zytokine

Als Zytokine werden spezielle Proteine bezeichnet, welche im Organismus als Botenstoffe der Zell-Zell-Kommunikation fungieren. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion werden sie von aktivierten lokalen Zellen sezerniert und können die Proliferation oder Differenzierung von Zielzellen einleiten oder die Zielzellen ebenfalls zur Sekretion weiterer Botenstoffe anregen. Es lassen sich als fünf Hauptgruppen die Interferone (IFN), Interleukine (IL), koloniestimulierenden Faktoren (CSF), Tumornekrosefaktoren (TNF) und Chemokine unterteilen. Funktionell unterscheidet man zwischen pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. $\text{TNF-}\alpha$, und anti-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-10 (Cox und Duff 1996).

1.5.1 Tumor Nekrose Faktor (TNF)

TNF (Tumor Nekrose Faktoren) zählen zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und werden bei inflammatorischem Stimulus von aktivierten Makrophagen, Lymphozyten, Natürlichen-Killer (NK)-Zellen und Epithelzellen sezerniert. Es werden drei große TNF-Klassen unterschieden: $\text{TNF-}\alpha$, LT (Lymphotoxin)- α , und $-\beta$ (Rahman und McFadden 2006). Die Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ wird vor allem über TNFR (TNF-Rezeptor)-I und TNFR-II vermittelt, im Ganzen umfasst die Familie der TNF-Rezeptoren aber bis zu 29 Rezeptorvarianten. TNFR-I ist ubiquitär im Organismus vorhanden, während TNFR-II primär auf Immun- und Endothelzellen exprimiert wird (Aggarwal 2003).

Als membranständiges Protein (memTNF) muß $\text{TNF-}\alpha$ zunächst durch das $\text{TNF-}\alpha$ -*converting enzyme* (TACE) enzymatisch abgespalten werden, um dann als lösliche Form (solTNF) seine parakrine Wirkung entwickeln zu können (O'Dea et al. 2005). Nach Ligand-Rezeptor-Bindung werden über nachfolgende Signalkaskaden u.a. die Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$, die Aktivierung von JNK (JUN N-terminale Kinase) oder die Bildung von Apoptosesignalen initiiert (Darnay and Aggarwal 1997). Bei pulmonaler Inflammation bewirkt die Ausschüttung von $\text{TNF-}\alpha$ zum Einen eine Hochregulation endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM-1, E-Selectin), was im

Einleitung

weiteren Verlauf zur Adhäsion von Leukozyten am Endothel und anschließender Transmigration von Neutrophilen in das Interstitium führt. Zum Anderen stimuliert TNF- α in lokalen Zellen (z.B. Alveolarmakrophagen, Alveolarepithelzellen) die Produktion weiterer chemotaktischer Botenstoffe zur Anlockung von Immunzellen (Ward 1996, Skerrett et al. 1999).

1.5.2 Makrophagen inflammatorisches Protein (MIP)-2

Das murine Makrophagen inflammatorische Protein (MIP)-2 gehört zur Superfamilie der Chemokine, zu welcher u.a. auch das murine MIP-1a und RANTES sowie das humane IL-8 und MCP-1 zählen. Die Zytokine dieser Untergruppe erfüllen eine wichtige Rolle als Mediatoren der Immunantwort durch Rekrutierung (Chemotaxis) und Aktivierung von Leukozyten und anderen Zellen bei Entzündungen, Infektionen und Neoplasien. MIP-2 wurde erstmals 1988 als Produkt einer mit Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) stimulierten Maus-Makrophagen-Tumorzelllinie (RAW 264.7) nachgewiesen (Wolpe et al. 1988). Auch bei der *in vitro*-Simulation einer pulmonalen Inflammation zeigte sich LPS als potenter Stimulus der MIP-2-Produktion (Huang et al. 1992, Xing et al. 1994). Generell kann MIP-2 von verschiedenen Zellen des Immunsystems, aber auch von Nicht-Immunzellen (z.B. Epithelzellen, Fibroblasten) synthetisiert werden (Driscoll 1994, Davatellis et al. 1989).

1.6 Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)

1.6.1 Grundlagen

PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren und gehören, wie u.a. auch die Retinoid-, Glukokortikoid- und Thyroid-Rezeptoren, zur Familie der nukleären Hormon-Rezeptoren (Evans 1988). Ihrem Namen entsprechend üben sie bei Aktivierung einen pleiotropen Effekt auf die zellulären Peroxisomen aus und steigern somit u. a. die β -Oxidation der Zielzelle.

Seit ihrer Erstbeschreibung 1990 (Issemann and Green 1990) haben die Erkenntnisse über Funktion und Bedeutung der PPAR kontinuierlich zugenommen. Bislang unterscheidet man drei verschiedene Isoformen des PPAR: α , β/δ und γ . Lokalisiert im Zellkern sind sie verantwortlich für die Regulation verschiedener Gene, welche an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt sind, z.B. am Lipidmetabolismus,

Einleitung

dem Glukosestoffwechsel, der Entzündungsreaktion, der Zelldifferenzierung oder dem Insulinstoffwechsel (Desvergne 1999, Vamecq 1999). Die PPAR-Isoformen unterscheiden sich in Lokalisation und Expression: während PPAR α primär in Leber, Herz, Darmmukosa und proximalem Nierentubulus nachgewiesen werden konnte, zeigt sich PPAR β/δ ubiquitär und in stärkerer Expression als die beiden anderen Subtypen. PPAR γ findet sich vor allem im Fettgewebe und in Zellen des Immunsystems (Braissant et al. 1996). Als Liganden am PPAR können sowohl natürliche als auch synthetische Substanzen fungieren. Zu den natürlichen Liganden zählen u.a. ungesättigte Fettsäuren, Prostaglandine und andere Eicosanoide, zu den synthetischen gehören Fibrate (am PPAR α) und Thiazolidindione (am PPAR γ) (Kersten and Wahli 2000).

1.6.2 Signalweg

Kommt es zur Bindung eines Liganden an den PPAR, so wird dieser zur Bildung eines heterodimeren Komplexes mit dem *retinoic acid receptor* (RXR) angeregt. Dieser Komplex transloziert in den Nukleus und bindet an eine spezifische Sequenz auf der DNA, dem *PPAR responsive element* (PPRE). Diese Sequenz befindet meist in der Promotorregion eines kodierenden DNA-Abschnitts und initiiert nach Bindung des PPAR/RXR-Heterodimers die Regulierung des nachfolgenden Gens (Abb. 3). Dies kann sowohl als Positiv- als auch als *Negativ-feedback* erfolgen (Desvergne 1999). Gleichzeitig kann der Liganden-aktivierte PPAR auf zwei weiteren Wegen eine Beeinflussung verschiedener Gene bewirken: zum Einen durch Bindung und Verbrauch gemeinsamer Coaktivatoren, was zu einer verminderten Aktivität von mit dem PPAR um den Coaktivator konkurrierenden Transkriptionsfaktoren führt, zum Anderen durch Liganden-abhängige Transrepression (*ligand-dependent transrepression*). Dabei kommt es zum direkten Protein-Protein-Kontakt zwischen dem Ligand-PPAR-Komplex und Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B, AP (*activator protein*)-1, STAT (*signal transducers and activators of transcription*) etc.), wodurch die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA verhindert wird und es zu einer verminderten Transkription der von ihnen regulierten Gene kommt (Straus und Glass 2007, Belvisi und Hele 2008).

Einleitung

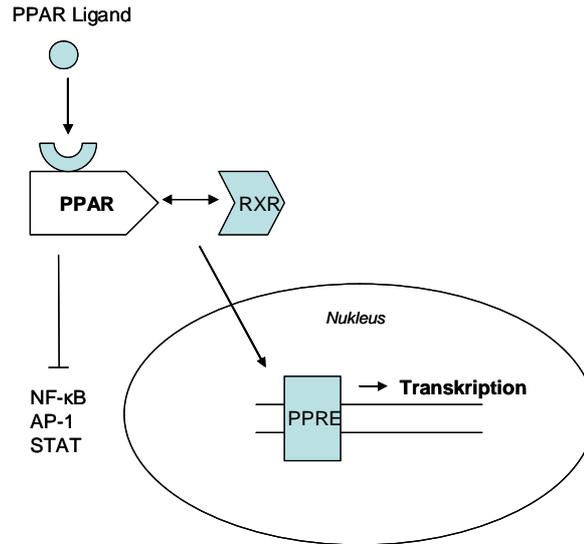


Abb. 3: Signalweg des PPAR

1.7 PPAR α

1.7.1 Wirkung

Der Subtyp α des PPAR war zunächst für seinen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel bekannt. Durch Experimente mit Mäusen, bei welchen das PPAR α – Gen ausgeschaltet war (PPAR α -knockout), war herausgefunden worden, dass die lipidsenkenden Wirkungen vom Fibrat-Analogen WY 14,643 und von Clofibrat über den PPAR α vermittelt werden (Lee et al. 1995). Die hypolipidämische Wirkung entsteht dabei durch die Aktivierung verschiedener Zielgene, welche u. a. eine Steigerung der Expression lipolytischer Enzyme, wie z.B. der Acyl-CoA-Oxidase, bewirken. Darüber hinaus kommt es zu einer erhöhten Hydrolyse von Plasmatriglyzeriden, einer gesteigerten zellulären Lipidaufnahme und einer verminderten Produktion von *very low density particles* (VLDLs) (Staels 1998). Dies erklärt, warum PPAR α vermehrt in Geweben mit einer hohen mitochondrialen und peroxisomalen β -Oxidationsaktivität exprimiert wird (z.B. Hepatozyten, Kardiomyozyten, Zellen des proximalen Nierentubulus, Darmmukosa (Braissant et al. 1996)). Aber auch in Endothelzellen und in intestinalen Epithelzellen konnte PPAR α bereits nachgewiesen werden (Cuzzocrea et al. 2006, Straus und Glass 2007). Des Weiteren besitzt der PPAR α anti-inflammatorische Aktivität. So kommt es nach Aktivierung durch einen seiner natürlichen Liganden, das pro-inflammatorische

Einleitung

Leukotrien B₄ (LTB₄), zu einem vermehrten Metabolismus eben dieses Liganden und damit zu dessen Inaktivierung. Im Tiermodell zeigten PPAR α - KO - Mäuse nach Gabe von LTB₄ einen protrahierten Entzündungsverlauf (Devchand et al. 1996). Staels konnte 1998 belegen, dass die Aktivierung von PPAR α in stimulierten glatten aortalen Muskelzellen zu einer Verminderung der Produktion von Interleukin-6 und Prostaglandin sowie zu einer geringeren Expression der COX-2 führt (Staels 1998). In Kardiomyozyten von Ratten zeigte sich unter PPAR α -Aktivierung eine verminderte Entzündungsreaktion und reduzierte Kollagenablagerung nach Stimulation mit Angiotensin II (Diep et al. 2002). Im Modell der murinen myokardialen Ischämie führte PPAR α -Aktivierung zu einer reduzierten Infarktausdehnung und einer Verbesserung der post-ischämischen kontraktiven Dysfunktion (Tabernero et al. 2002).

1.7.2 Liganden des PPAR α

Als natürliche Liganden können ungesättigte Fettsäuren, LTB₄ und 8-Hydroxyeicosatetraensäure (8-HETE) am PPAR α binden und ihn so aktivieren, wobei sich die einzelnen Substanzen in ihrer Bindungsaffinität zum Rezeptor unterscheiden (Devchand et al. 1996, Ferré 2004, Mishra et al. 2004). Zu den synthetischen Liganden zählen Verbindungen aus der Familie der Fibrate (z.B. Bezafibrat, Fenofibrat, Clofibrat) und deren Derivate (GW 7647, WY 14643). In der klinischen Anwendung kommen Fibrate bislang vor allem bei der Therapie von Hypertriglyzeridämien und (gemischten) Dyslipoproteinämien zum Einsatz (Kliwer et al. 1997, Cunard et al. 2002, Belvisi und Hele 2008). Bei Patienten mit Typ II-Diabetes und assoziierter Dyslipidämie konnte unter Anwendung von Fenofibraten eine Reduktion des Risikos für schwere diabetische Retinopathie gezeigt werden (Keech et al. 2007). Zusätzlich wird aber vermehrt ihr möglicher Einsatz u.a. bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, z.B. rheumatoider Arthritis (Shirinsky et al. 2012), Kolitis (Lee et al. 2007) oder Atherosklerose (Kleemann et al. 2011) erforscht.

1.7.3 PPAR α in der Lunge

Alle drei PPAR-Isoformen werden in der murinen Lunge exprimiert (Escher et al. 2001). In verschiedenen Studien konnte am Mausmodell ein protektiver Effekt von PPAR α -Aktivierung bei entzündlichen Lungenerkrankungen (ALI, Asthma) nachgewiesen werden (Delayre-Orthez et al. 2005, Delayre-Orthez et al. 2008, Schaefer

et al. 2008). Im Modell der Bleomycin-induzierten ALI zeigten PPAR α -/--Mäuse eine stärkere inflammatorische Reaktion und eine erhöhte Mortalität im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Gleichzeitig fand sich bei Behandlung der Wildtypiere mit WY 14,643 eine verminderte pulmonale Entzündungsreaktion im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Genovese et al. 2005).

1.8 Fragestellung

Dieser Arbeit vorausgegangen war eine Studie unserer Arbeitsgruppe, in welcher im Maus-Modell des akuten Lungenversagens mit intratrachealer LPS-Stimulation gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des PPAR α durch das Fibrat WY 14,643 zu einer Verminderung von pulmonaler Inflammation und vaskulärer leakage führt (Schaefer et al. 2008). Als weiterführende Fragestellungen ergaben sich nun:

- Wie reagieren isolierte Alveolarepithelzellen (AEC) Typ II *in vitro* auf einen inflammatorischen Stimulus?
- Entwickelt WY 14,643 seine anti-inflammatorischen Effekte in der Lunge über eine Wirkung auf die AEC II?
- Besteht ein Unterschied des Effekts bei *in vitro*-Applikation im Vergleich zu *in vivo*-Gabe des Fibrats?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere wurden Mäuse der Rasse 129S1/SvImJ (Wildtyp/WT) und 129S1/SvJae-PPAR α – Knockout (PPAR α -KO) verwendet. Es wurden Tiere beiderlei Geschlechts ab 25 g Gewicht in den Versuchen eingesetzt.

Die Aufzucht und Haltung erfolgte artgerecht bei Raumtemperatur und 50 % Luftfeuchtigkeit im 12 h–Tag-Nacht-Rhythmus unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung

2.2 Material

2.2.1 Materialien für die Tierhaltung

Käfige:

Makrolon, Typ II L

Charles River Deutschland GmbH,
Sulzfeld, Deutschland

Einstreu:

altromin Tiereinstreu-Granulat

Altromin GmbH + Co. KG,
Lage-Lippe, Deutschland

Futter:

altromin Standard-Diät

Altromin GmbH + Co. KG,
Lage-Lippe, Deutschland

2.2.2 Chemikalien, Materialien und Geräte für die Zellisolation

2.2.2.1 Chemikalien

Ketaminhydrochlorid (Ketavet), 100 mg/ml

Pfizer, Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

Xylazin (Rompun 2 %) <i>Ansatz: 1:1; 0,5 – 1,5 ml/Tier</i>	Bayer HealthCare , Leverkusen, Deutschland
Agarose <i>Ansatz: 100 mg auf 10 ml PBS -/-, steril</i>	Invitrogen , Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dispase	BD Biosciences , San Jose, California, USA
HBSS	PromoCell , Heidelberg, Deutschland
FCS (Fetal Calf Serum)	PAA Laboratories GmbH , Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (Pen 10000 U/ml, Strep 10 mg/ml)	PAN Biotech GmbH , Aidenbach, Deutschland
Glutamin (200 mM)	PAN Biotech GmbH , Aidenbach, Deutschland
DMEM high glucose (4,5 g/l) <i>Ansatz: + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep + 1 % Glutamin</i>	Sigma , St Louis, Missouri, USA
DMEM/F-12 + Heparin	Gibco , Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonuclease <i>Ansatz: 0,01% in DMEM/F-12 + Heparin</i>	Sigma , St Louis, Missouri, USA
DPBS -/-	PAN Biotech GmbH , Aidenbach, Deutschland

Material und Methoden

CD45 anti-mouse, biotinylated	BD Biosciences , San Jose, California, USA
CD16/32 anti-mouse, biotinylated	BD Biosciences , San Jose, California, USA
Streptavidin Magnetic Beads	Promega , Madison, Wisconsin, USA
Nile Red	Sigma , St Louis, Missouri, USA
WY 14,643	Alexis Biochemicals , Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland

Für Zellkultur: 0,324 mg in 100 µl Ethanol 99,9 % (= 10 000 µM)
+ 900 µl DMEM,
Einsatz in 1:10 Verdünnung in der Zellkultur (= 100 µM)

Für Fütterung: 1 mg in 200 µl Ethanol 99,9 %

Ethanol 99,9 %

2.2.2.2 Materialien

Operationsbesteck (Scheren, Pinzetten)	Rebstock Instruments GmbH , Dürbheim, Deutschland
Faden (Ethicon Ethibond Excel 5-0, Polyester-beschichtete Fäden ohne Nadel)	Johnson & Johnson , Brüssel, Belgien
Venenverweilkanüle (20G) als Trachealkatheter	B.Braun Melsungen AG , Melsungen, Deutschland

Material und Methoden

Zellsieb 100 μm	BD Biosciences , Bedford, Massachusetts, USA
Zellsieb 40 μm	BD Biosciences , Bedford, Massachusetts, USA
Nylon Net Filter 20 μm	Millipore Corporation , Billerica, Massachusetts, USA
Stericup & Steritop Filtersystem	Millipore Corporation , Billerica, Massachusetts, USA
Zählkammer (Neubauer improved)	LO Laboroptik GmbH , Friedrichsdorf, Deutschland
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel-Gläser , Braunschweig, Deutschland
Zellkulturschalen (6-/12-well)	greiner bio-one GmbH , Kremsmünster, Österreich
Eppendorf-Cups (1,5 ml)	Eppendorf AG , Hamburg, Deutschland
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	greiner bio-one GmbH , Kremsmünster, Österreich
Pasteurpipetten	VWR International , Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen (10 μl , 200 μl , 1000 μl)	Sarstedt AG , Nümbrecht, Deutschland

Material und Methoden

Konische Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences , Bedford, MA, USA
Einmalspritzen (1 ml, 5 ml, 20 ml)	B.Braun Melsungen AG , Melsungen, Germany
<u>2.2.2.3 Geräte</u>	
Magnetic Separation Stand	Promega , Madison, Wisconsin, USA
Zentrifugen (Rotina 46R, Mikro 22R)	Hettich Lab Technology , Tuttlingen, Deutschland
Mikroskop (Axiovert S 100)	Carl Zeiss Microimaging GmbH , Göttingen, Deutschland
Wärmeschrank (Hera Cell)	Heraeus , Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Sicherheitswerkbank (Hera Safe)	Heraeus , Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Wasserbad	B.Braun Melsungen AG , Melsungen, Deutschland
Vortex-Schüttler	Merck , Darmstadt, Deutschland
Shaker (duomax 1030)	Heidolph Instruments , Schwabach, Deutschland
Waage (PB 303 Delta Range)	Mettler Toledo , Giessen, Deutschland
Waage (Mettler AJ100)	Mettler Toledo , Giessen, Deutschland

Material und Methoden

2.2.3 Chemikalien, Materialien und Geräte für die *in vitro* Bestimmung

2.2.3.1 Chemikalien

LPS (20 µg/ml) **Sigma**, St Louis, Missouri, USA

Ansatz: 10 mg in 10 ml NaCl 0,09 % lösen (1 µg/µl)

RIPA-Puffer DPBS -/-
 1 % Triton
 0,5 % Natriumdeoxychololat
 0,1 % SDS (10 %)

+ Inhibitoren (Aprotinin, Leupeptin, Okadacid, Na-Orthovanadat, PMSF)
(unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt)

Aprotinin **Sigma**, St Louis, Missouri, USA

Ansatz: 1 mg in 1 ml H₂O

Leupeptin **Sigma**, St Louis, Missouri, USA

Ansatz: 1 µg in 1 µl H₂O

Okadic acid **Sigma**, St Louis, Missouri, USA

Ansatz: 10 µg in 1216,5 µl H₂O

Natrium (Na)-Orthovanadat **Sigma**, St Louis, Missouri, USA

Ansatz: 100 mg in 5,4 ml H₂O (100 mM)

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) **Sigma**, St Louis, Missouri, USA

Ansatz: 10 mg in 1 ml Isopropanol

BSA-Standard

(Bovines Serumalbumin)

PAA Laboratories GmbH,
Pasching, Österreich

Material und Methoden

Bio-Rad DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories , Hercules, California, USA
Rainbow (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder)	Fermenta Biotech , Maharashtra, India
Cox-1 (murine) polyclonal Antibody	Cayman Chemical Company , Ann Arbor, Michigan, USA
Cox-2 (murine) polyclonal Antibody	Cayman Chemical Company , Ann Arbor, Michigan, USA
Phospho-NF- κ B p65 monoclonal Antibody	Cell Signalling Technology , Boston, Massachusetts, USA
I κ B α monoclonal Antibody	Cell Signalling Technology , Boston, Massachusetts, USA
goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology , Santa Cruz, California, USA
β -actin Antibody: Ms mAb to beta Actin	Abcam , Cambridge, Massachusetts, USA
Vinculin monoclonal antibody	Sigma-Aldrich , St.Louis, Missouri, USA
goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology , Santa Cruz, California, USA
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma , St Louis, Missouri, USA
N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma , St Louis, Missouri, USA

Material und Methoden

→ auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Einsatz: 100 ml + 400 ml Aqua dest.

Transferpuffer	Tris (25 mM)	6,04 g
	Glycin (192 mM)	28,8 g
	Methanol 20 %	400 ml
	SDS 10%	20 ml

→ auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Tween 20 Sigma Ultra **Sigma**, St Louis, Missouri, USA

Waschpuffer	TBS 10x	300 ml
	Tween 20	3 ml

→ auf 3000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Skim Milk Powder **Fluka BioChemika**, Buchs, Schweiz

Blockingpuffer (5 %) Waschpuffer		500 ml
	Skim Milk Powder	25 g

ECL Plus Western Blotting Detection System
(Lösung A + Lösung B, Verhältnis 40:1) **GE Healthcare**, München,
Deutschland

DuoSet ELISA Development System
mouse TNF α , MIP-2 **R&D Systems**, Minneapolis,
Minneapolis, USA

Waschpuffer	Tween	0,5 ml
	Tris 20 mM	2,4 g

Material und Methoden

→ auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen (pH 7,3)

Blockpuffer	BSA	1 g
	Saccharose	5 g
	NaN ₃	0,05 g
	PBS 1x	100 ml

Diluent	BSA	0,2 g
	Tween	0,1 ml
	Tris base 20 mM	0,48 g
	NaCl 150 mM	1,75 g

→ auf 200 ml mit Aqua dest. auffüllen (pH 7,3)

Substratpuffer	Na-Acetat	8,2 g
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	6,9 g

→ auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen (pH 4,2)

TxB ₂ Enzyme Immunoassay Kit	Assay Designs , Ann Arbor, Michigan, USA
---	---

Parameter PGE ₂ Assay	R&D Systems , Minneapolis, Minneapolis, USA
----------------------------------	--

RNeasy Mini Kit	Qiagen , Hilden, Deutschland
-----------------	-------------------------------------

QIAshredder	Qiagen , Hilden, Deutschland
-------------	-------------------------------------

ImProm II Reverse Transkriptase (RT)	Promega , Madison, Wisconsin, USA
--------------------------------------	--

PCR Nucleotide Mix	Promega , Madison, Wisconsin, USA
--------------------	--

Material und Methoden

RNasin **Promega, Madison, Wisconsin, USA**

Oligo (dt) Primer **Promega, Madison, Wisconsin, USA**

H₂O **Promega, Madison, Wisconsin, USA**

Gen	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer	Produktgröße
MIP-2	agt gaa ctg cgc tgt caa tg	gcc ctt gag agt ggc tat ga	
COX-1	cac aac act tea ccc acc ag	aga gcc gca ggt gat act gt	135 bp
COX-2	ggc cat gga tgg gac tta aa	acc tct cca cca atg acc tg	110 bp
mPTGES	gct gtc atc aca ggc cag at	gct cca cat ctg ggt cac tc	109 bp
15-PGDH	agg tag cat tgg tgg att gg	cca cat cac act gga cga ac	105 bp
PPAR alpha	tat tcg gct gaa gct ggt gta c	ctg gca ttt gtt ccg gtt ct	76 bp

Tab.1: Verwendete Primer für RT-PCR

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG **Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland**

MgCl₂ **Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland**

2.2.3.2 Materialien

Eppendorf-Cup (1,5 ml) **Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland**

Cell Scraper **Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Deutschland**

Material und Methoden

Gel Blotting Papier	Whatman , Maidstone, Kent, UK
Transfer Membran 0,45 µm	PALL Corporation , Port Washington, New York, USA
Transparentfolie	DOW Europe , Edegem, Belgien
Fotopapier Agfa Crurix HT1.000 G Plus	AGFA Graphics Germany GmbH & Co.KG , Düsseldorf, Deutschland
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare , München, Deutschland
96-well Mikrotiterplatte	Nunc, Thermo Fisher Scientific , Langenselbold, Deutschland
<u>2.2.3.3 Geräte</u>	
Elektrophoresekammer	Keutz Labortechnik , Reiskirchen, Deutschland
Blottingkammer	Keutz Labortechnik , Reiskirchen, Deutschland
Heizblock	HLC BioTech , Bovenden, Deutschland
Entwickler (Crurix 60)	AGFA Graphics Germany GmbH & Co.KG , Düsseldorf, Deutschland
ELISA-Reader	Bio-TEK Instruments Inc. , Winooski, Vermont, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Isolation und Kultivierung von Alveolarepithelzellen Typ II (AEC II)

2.3.1.1 Zellisolation

Die Versuchstiere wurden mit einer intraperitoneal verabreichten Mischung aus Ketamin und Xylazin (Verhältnis 1:1) euthanasiert. Je nach Gewicht des Tieres wurden dafür 500 – 1500 µl des Anästhetikums injiziert.

Für die Entnahme der Lunge wurden die Tiere in Rückenlage auf der Unterlage fixiert. Es erfolgte die Eröffnung des Abdomens durch Längslaparotomie und anschließende sternale Thorakotomie. Nach Inzision des linken Herzvorhofs wurde die Lungengefäße durch Punktion des rechten Ventrikels und Injektion von ca. 20 ml HBSS blutfrei gespült.

Es folgte die Freilegung der Trachea mit Tracheotomie und Einbringen eines Trachealtubus. Über diesen wurden zunächst 1,5 ml auf 37 °C erwärmte Dispase, sowie anschließend 0,5 ml flüssige Agarose in die Luftwege eingebracht. Nach ca. 2-minütiger Wartezeit zur Aushärtung der Agarose wurde die Lunge aus dem Thorax herauspräpariert, die anhängenden Organe (Herz, Thymus) entfernt und die Lunge, nach äußerer Spülung mit 2 ml HBSS, für 40 min bei Raumtemperatur in 2 ml Dispase inkubiert.

Das weitere Arbeiten erfolgte nun unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden das Lungengewebe vorsichtig mit zwei Pinzetten vom Bronchialbaum gelöst, zerkleinert und für 7-8 min in 8 ml DMEM + HEPES + 0,01 % DNase bei Raumtemperatur auf einem Shaker inkubiert. Nach Homogenisierung des Gewebes mittels Pipette wurde die Zellsuspension nacheinander über drei verschieden große Filter (100 µm, 40 µm, 20 µm) filtriert und anschließend abzentrifugiert (800 rpm, 4 °C, 8 min). Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium (DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1% Glutamin) resuspendiert und mit 25 µl des CD16/32-Antikörpers sowie 50 µl des CD45-Antikörpers für 1 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

Material und Methoden

In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der magnetischen *beads*. Dafür wurden 125 µl *beads* vor Gebrauch in ca. 10 ml PBS gelöst und für 15 min im Magnetseparator belassen. Der Überstand wurde abgesaugt und die *beads* in ca. 2 ml PBS resuspendiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet in 5 ml HBSS gelöst. Das Zelllysate wurde zu den *beads* hinzugegeben und beides zusammen für 30 min bei RT auf dem Shaker inkubiert. Im Anschluss wurde die Mischung 15 min im Magnetseparator belassen. Danach wurde der Überstand abgenommen, nochmals zentrifugiert und das gewonnene Pellet für die Zellzählung in 4 ml Medium resuspendiert.

Für die Zellzählung wurden 500 µl PBS, 25 µl der Zellsuspension und 10 µl NileRed-Färbelösung in ein Eppendorf-Cup pipettiert, gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Dann wurden 10 µl der Lösung auf eine Neubauer-Zählkammer aufgebracht und die Alveolarepithelzellen Typ II unter dem Mikroskop quantifiziert.

Anschließend wurden 5×10^5 Zellen pro well in 1 ml Medium auf einer 12-well-Zellkulturplatte ausgesät und in den Brutschrank gestellt.

2.3.1.2 Kultivierung der AEC II

Die isolierten Zellen wurden nach der Aussaat in Zellkulturschalen zum Wachstum und zur Adhäsion im Brutschrank inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde unter Zugabe von WY 14,643 (100 µM) in das Medium kultiviert.

Nach 18 h erfolgte die Zugabe von LPS in einer Konzentration von 10 ng/µl, bzw. für die Kontrollgruppen die Zugabe einer äquivalenten Menge Medium. Die Dauer der LPS-Stimulation betrug je nach Versuch 1, 2, 4, 8, oder 24 h.

2.3.1.3 Abstoppen des Versuchs

Nach insgesamt 36 h Kultur wurde der Mediumsüberstand abgenommen, in Eppendorf-Cups überführt und bei -20 °C für die Bestimmung von Zytokinen und Eicosanoiden eingefroren.

Die Zellkulturschale wurde auf Eis gestellt und die wells jeweils 2 x mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurden je 100 µl Ripa-Puffer + Inhibitoren in die wells gegeben und die adhärenen Zellen mit einem Scraper gelöst. Das in Eppendorf-Cups überführte Zelllysate wurde auf Eis für ca. 25 min inkubiert und währenddessen wiederholt gevortext. Es folgte eine abschließende Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 15 min) und das Überführen des Überstandes in neue Eppendorf-Cups, bevor die Proben in flüssigem

Material und Methoden

Stickstoff schockgefroren und dann für Proteinbestimmung und Western Blots bei -80 °C gelagert wurden.

Für die Isolation der RNA wurden zu den adhärenen Zellen 350 µl RLT-Puffer + β-Mercaptoethanol hinzugegeben, die Zellen mit dem Scraper gelöst und in Eppendorf-Cups überführt. Die Proben wurden sofort bei -80 °C eingefroren.

2.3.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts im Zelllysate erfolgte gemäß dem BIORAD-Protokoll. Als Standard wurde Bovines Serumalbumin (BSA) in einer Verdünnungsreihe verwendet.

Die zu messenden Proben wurden in den Wells entweder pur (5 µl Probe) oder verdünnt (z.B. 1:2, d.h. 2,5 µl Probe + 2,5 µl A.dest.) eingesetzt. Anschließend wurden in alle Wells (Standard und Proben) zunächst 25 µl Lösung A (= 1 ml Reagenz A + 20 µl Reagenz S) und dann 200 µl Lösung B gegeben, worauf es zu einem Farbumschlag kam. Dadurch konnte anschließend die Proteinkonzentration mittels eines ELISA-Readers bei 550 nm photometrisch bestimmt werden.

2.3.3 Western Blot (Gelelektrophorese)

Für die Gelelektrophorese wurden zunächst die Gele vorbereitet. Dafür wurde zwischen zwei in einer Halterung befestigten Glasplatten zunächst das Trenngel (8 %) pipettiert (ca. 5 ml) und zur Begradigung mit 100 µl Ethanol überschichtet. Nach etwa 15 min. war das Trenngel fest, der Ethanol konnte abgegossen und das Sammelgel aufpipettiert werden (ca. 1 ml). Direkt im Anschluss wurden Kämme mit einem Taschenvolumen von 25 µl zur Ausformung der Taschen in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt. Die Gele wurden entweder direkt verwendet oder bei 4 °C bis zum nächsten Tag gelagert.

Je nach Proteinkonzentration der Probe wurde ein definiertes Volumen aus der Probe entnommen, so dass beim Auftragen auf das Gel jede Tasche eine Proteinmenge von 8 µg enthielt. Vor dem Auftragen auf das Gel erfolgte die Zugabe einer definierten Menge an Probenpuffer (2-fach oder 10-fach) und die Proben wurden für 5 min bei 100 °C im Heizblock gekocht. Nach anschließender Befüllung der Taschen und dem Einsatz der Gele in die Elektrophoresekammer wurde diese zusätzlich mit 500 ml Laufpuffer gefüllt. Dann wurde per Anlegen von Strom die Gelelektrophorese gestartet (100 V, 100 mA, 100 W, Dauer 1 h 30 min).

Material und Methoden

Während der Gelelektrophorese wurden pro laufendem Gel sechs Stücke Filterpapier zurechtgeschnitten und in Transferpuffer eingeweicht. Von der Transfermembran wurde pro Gel ein Stück zurechtgeschnitten und zunächst 2 min in Methanol aktiviert, dann 2 min in Aqua dest. gewaschen und schließlich ebenfalls in Transferpuffer gelegt.

Nach Ende der Elektrophorese wurden die Gele aus der Halterung genommen, vorsichtig von den Glasplatten gelöst und für einige Minuten zusammen mit der Transfermembran in Transferpuffer geschwenkt. Dann wurden Membran und Gel zwischen je drei Stück Filterpapier (drei oben, drei unten) in die Blottingkammer gelegt, diese wurde verschlossen und der Proteintransfer (Blot) durch Anlegen von Strom gestartet (100 V, 100 mA, 100 W, Dauer 1 h 15 min).

Nach dem Transfer wurden die Membranen für 1 h in Blockingpuffer gegeben, um unspezifische Bindungen zu blocken. Es folgte über Nacht die Inkubation mit dem

1. Antikörper (COX-1, COX-2, Phospho-NF- κ B, I κ B α , Vinculin oder β -actin). Nach mehreren Waschschritten (3 x 5 min in Waschpuffer auf dem Shaker mit Austausch des Puffers nach jedem Schritt) wurde der 2. Antikörper (anti-rabbit, 1:2000 bzw. anti-mouse, 1:3000) für 1 h hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Membranen wiederum mehrmals gewaschen (2 x 15 min, 3 x 5 min).

Nach sorgfältiger Trocknung der Membranen wurde das ECL darauf aufgetragen und für 5 min bei RT inkubiert. In der Dunkelkammer wurde das Fotopapier für einen definierten Zeitraum auf die Membranen aufgelegt und der Film anschließend entwickelt.

2.3.4 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

2.3.4.1 TNF- α / MIP-2 (Sandwich-Methode)

Am Vortag wurde zur Vorbereitung der Capture-antibody (goat anti-mouse TNF- α , 1. Antikörper) mit PBS -/- verdünnt (c= 0,8 μ g/ml) und in die wells einer 96well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, damit der Antikörper auf dem Boden anhaften konnte.

Am nächsten Tag wurden die wells zunächst 3 x mit Waschpuffer gewaschen und dann für 1 h mit Blockingpuffer beschichtet, um unspezifische Bindungen zu blocken. Nach einem weiteren Waschschriff wurden der Standard (in Verdünnungsreihe mit Diluent) und die zu messenden Proben in die wells pipettiert und die Platte für 2 h bei RT inkubiert. Hierbei fand

Material und Methoden

nun eine Bindung der gesuchten Antigene an den am Plattenboden haftenden Antikörper statt. Die überschüssigen Antigene wurden nach Ende der Inkubation in drei Schritten abgewaschen.

Dann erfolgte die Zugabe des biotinmarkierten Detection-antibodies (2. Antikörper) und wiederum eine Inkubation für 2 h bei RT, währenddessen sich der 2. Antikörper an das am 1. Antikörper fixierte Antigen binden konnte. Anschließend wurde die Platte wiederum 3x gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde mit einem Enzym (HRP) konjugiertes Streptavidin in Verdünnung (1:200) in die wells pipettiert, welches mit hoher Affinität an Biotin bindet. Die Platte wurde dann für 20 min bei RT inkubiert und die überschüssigen Moleküle danach abgewaschen. Anschließend wurde das Substrat (H_2O_2 + Tetramethylbenzidin, 1:1) hinzugegeben, die Enzymreaktion nach 20 min durch Addition von Schwefelsäure abgestoppt und die Endpunkt-Konzentration im ELISA-Reader bei 450 nm Wellenlänge bestimmt.

2.3.4.2 PGE₂ (kompetitive Methode)

In die mit goat anti-mouse polyklonalem Antikörper beschichteten wells einer 96-well-Mikrotiterplatte wurden Standardreihe, Kontrolle und die zu messenden Proben pipettiert. Hinzu kam der mit blauem Farbstoff markierte Erstantikörper (mouse anti-PGE₂ monoklonal) und die Platte wurde für 1 h bei RT auf dem Shaker inkubiert.

Es folgte die Zugabe von HRP-konjugiertem PGE₂, welches nun mit dem in den Proben enthaltenen PGE₂ um die Bindungsstellen am Antikörper konkurrierte. Nach einer weiteren Inkubation von 2 h wurden die wells vier mal gewaschen und anschließend die Substratlösung hinein pipettiert (H_2O_2 + Tetramethylbenzidin, 1:1). Die Platte wurde nun lichtgeschützt für 30 min stehen gelassen.

Per Zugabe von Schwefelsäure wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt und die Farbreaktion bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Konzentration von in der Probe enthaltenem PGE₂ war dabei umgekehrt proportional zur gemessenen Farbintensität, denn je mehr HRP-konjugiertes PGE₂ an freie Antikörper hatte binden können, desto stärker war die anschließende Farbreaktion durch die Peroxidase.

Material und Methoden

2.3.4.3 TxB₂ (kompetitive Methode)

In die mit goat anti-rabbit polyklonalem Antikörper beschichteten wells einer 96well-Mikrotiter-Platte wurden der Standard und die zu messenden Proben pipettiert. Es folgte die Zugabe von einem Konjugat aus alkalischer Phosphatase und TxB₂ sowie des Erstantikörpers (rabbit anti-TxB₂, polyklonal). Die Platte wurde anschließend für 2 h bei RT auf dem Shaker inkubiert. Es konkurrierten nun das in der Probe enthaltene TxB₂ und das Konjugat um die Bindungsstellen am Erstantikörper.

Nach 3-maligem Waschen der wells erfolgte die Addition des Substrats (p-Nitrophenyl-Phosphat) und eine Inkubation für 45 min. Durch Zugabe einer Stopplösung wurde die Enzymreaktion dann beendet und die Farbreaktion bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen. Dabei war die Konzentration des in der Probe enthaltenen TxB₂ umgekehrt proportional zur gemessenen Farbintensität.

2.3.5 RT(Real-time)-PCR

2.3.5.1 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA wurden die Zellen zunächst in 350 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol lysiert. Dann wurde die Isolation der RNA gemäß dem Protokoll für das RNeasy Mini Kit durchgeführt. Dabei wurden die Proben zunächst auf einen QIAshredder pipettiert und durch Zentrifugation homogenisiert. Das erhaltene Lysat wurde dann, nach Zugabe einer äquivalenten Menge von Ethanol (70%), auf eine Säule gegeben, an welche die RNA bindet. Nach mehreren Waschschrritten konnte die gereinigte RNA dann durch Zugabe von RNase-freiem Wasser von der Säule gelöst und der enthaltene Gesamt-RNA-Gehalt mittels Spectrophotometrie bestimmt werden. Anschließend wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.3.5.2 c-DNA-Synthese

Zur Synthese der c-DNA wurde folgendes Protokoll verwendet:

Ansatz 1:

RNA	100 ng
Oligo (dt) Primer	1 µl (0,5 µg)
H ₂ O	ad 5 µl

Material und Methoden

Ansatz 1 bei für 5 min bei 70°C inkubieren, dann Proben auf Eis geben.

Hinzugeben:

5x RT Puffer	4 µl
MgCl ₂ (25mM)	4,8 µl (3mM)
Nucleotide Mix	1 µl (0,5 mM)
RT	1 µl
RNAsin®	1 µl
H ₂ O	3,2 µl

Dann folgten 3 Inkubationsschritte: 1. für 5 min bei 25°C
2. für 60 min bei 42°C
3. für 5 min bei 70°C

Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.3.5.3 Real-time PCR (polymerase chain reaction)

Zur Durchführung der Real-time PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

Ansatz:

SYBR Green SuperMix	12,5 µl
cDNA	1 µl
Primer	1 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
H ₂ O	9,5 µl

Es folgten mehrer Inkubationsschritte:	2 min bei 50°C	1x	} 40 Zyklen
	2 min bei 95°C	1x	
	10 min bei 95°C		
	10 min bei 59°C		
	10 min bei 72°C		

Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

2.4 Protokoll der Experimente

Für alle Experimente wurden Alveolarepithelzellen vom Typ II (AEC II), isoliert aus PPAR α -Wildtyp (WT)- bzw. PPAR α -Knockout (KO)-Mäusen, verwendet.

2.4.1 Gruppeneinteilung

1. WT-Mäuse

- | | | |
|-----|----------------------|---|
| 1.1 | AEC II von WT-Mäusen | -/+ 10 ng LPS/24h |
| 1.2 | AEC II von WT-Mäusen | -/+ 10 ng LPS/24h
+ Fütterung mit 1 mg WY 14,643/d für
14d |
| 1.3 | AEC II von WT-Mäusen | -/+ 10 ng LPS/24h
+ 100 μ M WY 14,643 in der Kultur |
| 1.4 | AEC II von WT-Mäusen | -/+ 10 ng LPS/24h
+ Fütterung mit 1 mg WY 14,643/d für
14d
+ 100 μ M WY 14,643 in der Kultur |

2. KO-Mäuse

- | | | |
|-----|----------------------|---|
| 2.1 | AEC II von KO-Mäusen | -/+ 10 ng LPS/24h |
| 2.2 | AEC II von KO-Mäusen | -/+ 10 ng LPS/24h
+ Fütterung mit 1 mg WY 14,643/d für
14d |
| 2.3 | AEC II von KO-Mäusen | -/+ 10 ng LPS/24h
+ 100 μ M WY 14,643 in der Kultur |
| 2.4 | AEC II von KO-Mäusen | -/+ 10 ng LPS/24h
+ Fütterung mit 1 mg WY 14,643/d für
14d
+ 100 μ M WY 14,643 in der Kultur |

2.4.2 Zeitverlauf

Die Mäuse wurden ab Tag 0 mit 10 g Futter/d gefüttert, dabei wurde je nach Gruppenzugehörigkeit dem Futter 1 mg WY 14,643/d oder lediglich der Trägerstoff (Ethanol 99 %) zugefügt.

Am Tag 14 wurden die Tiere euthanasiert, jeweils wurde die Lunge entnommen und die Alveolarepithelzellen vom Typ II (AEC II) daraus isoliert.

Die isolierten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturschalen mit oder ohne Zugabe von WY 14,643 (100 µM) kultiviert und nach 18 h für 0, 1, 4, 8 oder 24 h mit 10 ng LPS stimuliert.

Nach insgesamt 36 h wurden die Versuche abgestoppt. Die Mediumsüberstände wurden zur Bestimmung von Zytokinen (TNF- α , MIP-2), Thromboxan B₂ (TxB₂) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) bei -20°C eingefroren.

Die adhärennten Zellen wurden lysiert und zur Bestimmung von COX-1, COX-2, mPTGES, 15-PGDH und MIP-2 mRNA (PCR), sowie COX-1 und -2 Protein (Western Blot) bei -80°C eingefroren.

2.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden von den Ergebnissen aller Gruppen die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Zum Vergleich der unstimulierten und stimulierten bzw. unbehandelten und behandelten Gruppen wurde eine Ein-faktorielle ANOVA angewendet. Für nicht normal verteilte Ergebnisse wurde eine vorherige log-Transformation der Daten durchgeführt. Der Student-Newmans-Keuls-Test folgte als post-hoc-Test auf die Varianzanalyse.

Als statistisch signifikant wurde eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaStat Windows (Release 3.5). Die Grafiken wurden mit dem Programm Microsoft Office Excel 2003 für Windows XP erstellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Tierzahlen

Insgesamt wurden die Daten von 156 Mäusen (PPAR α -WT und PPAR α -KO) in die Wertung einbezogen.

3.2 Entzündungsreaktion in AEC II

Lipopolysaccharid (LPS) kann als physiologischer Stimulator einer inflammatorischen Reaktion in der Zellkultur eingesetzt werden. In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchsaufbau sollte LPS den Ablauf einer Entzündungsreaktion in AEC II initiieren und modellhaft das Verhalten der AEC II bei einer pulmonalen Inflammation, z.B. im Rahmen eines akuten Lungenversagens (ARDS), darstellen.

3.2.1 LPS-Stimulation steigert die Expression proinflammatorischer Parameter in AEC II

Aus WT-Mäusen isolierte AEC II wurden für 36 h kultiviert und dann (je nach Versuchsreihe) für 1, 2, 4, 8 oder 24 h mit 10 ng/ μ l LPS stimuliert. Für die Untersuchung der NF- κ B- und I κ B α -Expression wurden Stimulationszeitpunkte von 5, 10 und 30 min sowie 1h und 4h gewählt.

Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die adhärennten Zellen lysiert. Aus dem Zelllysate wurden intrazelluläre Proteine per Western Blot (NF- κ B, I κ B α , COX-1, COX-2) und mRNA (COX-1, COX-2, mPTGES, 15-PDGH, MIP-2) per RT-PCR bestimmt, während im Überstand TxB₂, TNF- α , MIP-2 und PGE₂ per ELISA quantifiziert wurden.

Ergebnisse

Für aktiviertes NF- κ B (Phospho-NF- κ B) zeigte sich bereits nach 5 min Stimulationsdauer ein Anstieg der Expression, welche ihr Maximum nach 1h Stimulation erreichte. Das Inhibitorprotein I κ B α wies einen entgegengesetzten Verlauf auf, mit Abfall der Expression nach 15 min Stimulation und erneutem Anstieg ab 1h Stimulationsdauer (Abb. 4).

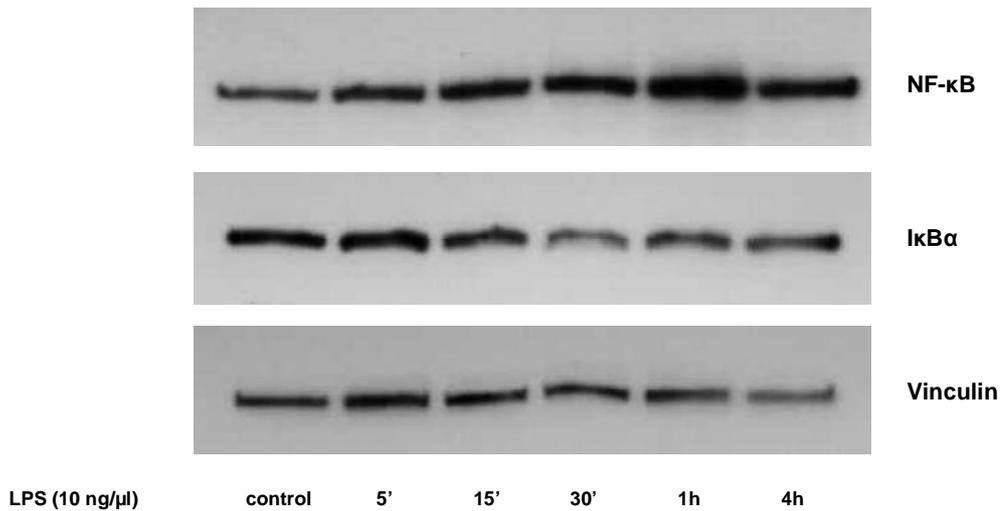
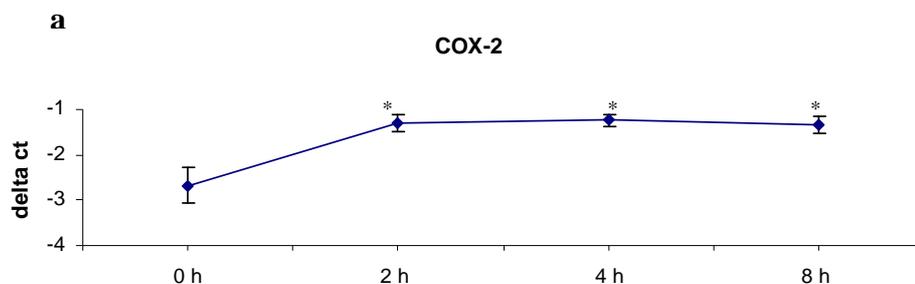


Abb. 4: Phospho-NF- κ B- und I κ B α -Expression in stimulierten AEC II

Aus WT-Mäusen isolierte und für 36 h kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/ μ l) stimuliert und die Expression von Phospho-NF- κ B und I κ B α nach 5, 15 und 30 min sowie nach 1h und 4h im Western Blot quantifiziert.

Im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen zeigte sich nach LPS-Stimulation ein deutlicher Anstieg der COX-2-Expression zu allen gemessenen Zeitpunkten (1, 4, 8 und 24 h) (Abb. 5).



Ergebnisse

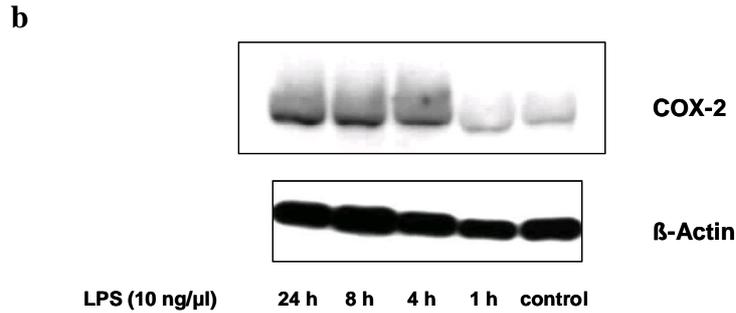


Abb. 5: COX-2-Expression in stimulierten AEC II

Aus WT-Mäusen isolierte und für 36 h kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/μl) stimuliert und die relative Expression der COX-2 mRNA (Δ ct) nach 0, 2, 4 und 8 h per RT-PCR bestimmt (Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *= p <0,05 vs. 0h) (a). Die Proteinexpression nach 0, 1, 4, 8 und 24 h LPS-Stimulation wurde im Western Blot quantifiziert (b).

Bei Quantifizierung der COX-1 mRNA per RT-PCR zeigte sich nach LPS-Stimulation für 2, 4 oder 8 h erwartungsgemäß kein Unterschied in der Expression im Vergleich zum Kontrollwert (0 h) (Abb. 6).

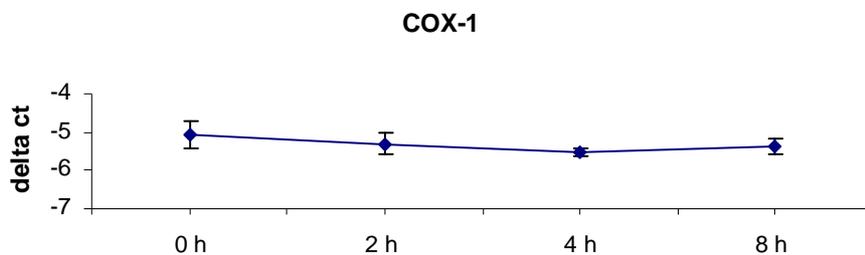


Abb. 6: COX-1-mRNA in stimulierten AEC II

Aus WT-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/μl) stimuliert und die relative Expression der COX-1 mRNA (Δ ct) nach 0, 2, 4 und 8 h per RT-PCR bestimmt (dargestellt sind MW \pm SEM, n=3).

Ergebnisse

Die Konzentrationen von TxB_2 und pro-inflammatorischen Zytokinen ($\text{TNF-}\alpha$, MIP-2) im Überstand nach 2, 4, 8 und 24 h Stimulation waren im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle deutlich erhöht (Abb. 7, 8).

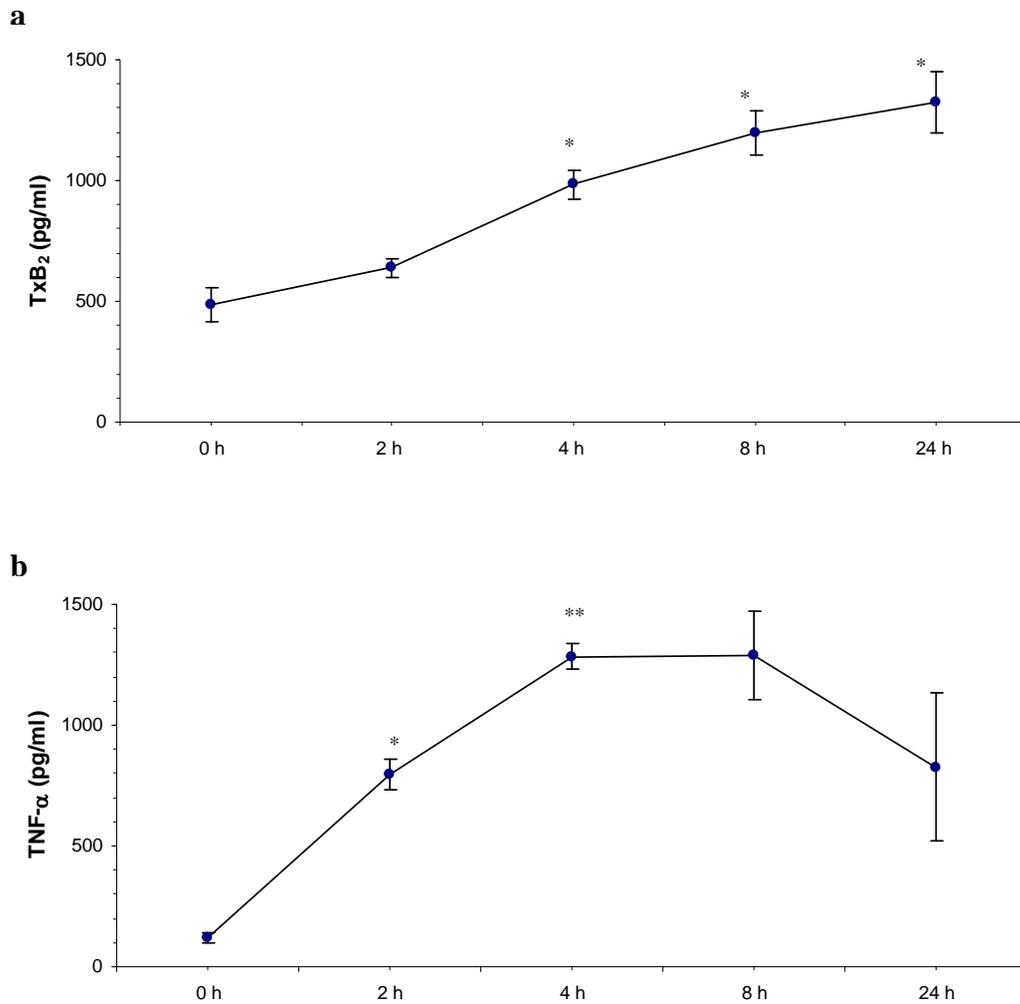


Abb. 7: TxB_2 - und $\text{TNF-}\alpha$ -Konzentration im Überstand von stimulierten AEC II

Aus WT-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 $\text{ng}/\mu\text{l}$) stimuliert und die Konzentration von TxB_2 (a) und $\text{TNF-}\alpha$ (b) im Überstand nach 0, 2, 4, 8 und 24 h per ELISA quantifiziert (dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SEM}$, $n=3$, $*=p<0,05$ vs. 0h, $**=p<0,01$ vs. 0h).

Ergebnisse

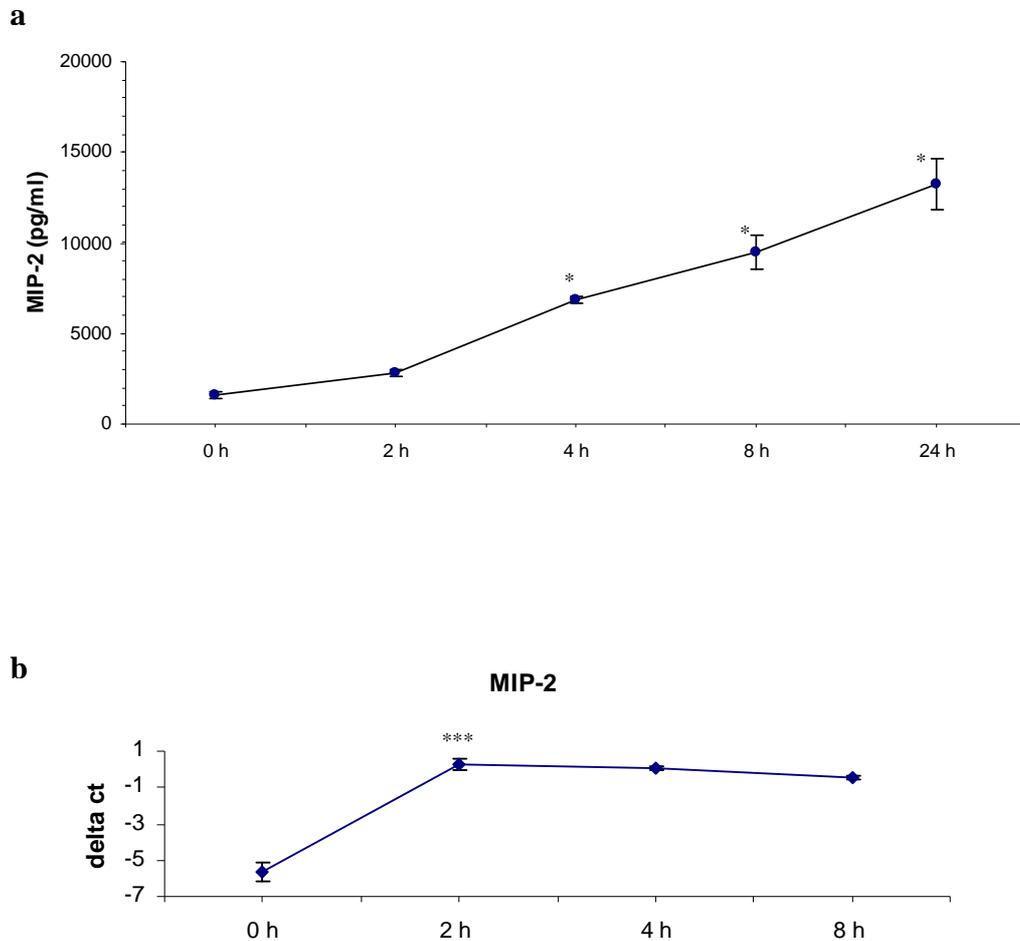


Abb. 8: MIP-2-Konzentration im Überstand und MIP-2-mRNA in stimulierten AEC II

Aus WT-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/ μ l) stimuliert und die Konzentration von MIP-2 im Überstand nach 0, 2, 4, 8 und 24 h per ELISA quantifiziert (a). Die relative Expression der MIP-2 mRNA (Δ ct) wurde nach 0, 2, 4 und 8 h per RT-PCR bestimmt (b) (dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *= p <0,05 vs. 0h, ***= p <0,001 vs. 0h).

Die PGE₂-Konzentration im Überstand wurde lediglich nach 24 h LPS-Stimulation bestimmt und zeigte dabei ebenfalls im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle einen signifikanten Anstieg (4693 \pm 270 pg/ml vs. 1679 \pm 309 pg/ml, p <0,01) (ohne Abbildung).

Ergebnisse

Bei Darstellung der 15-PGDH mRNA in AEC II zeigte sich nach LPS-Stimulation für 4 h und 8 h eine sigifikant reduzierte Expression im Vergleich zum Kontrollwert. Auf die Expression der mPTGES mRNA war kein signifikanter Einfluss durch LPS-Stimulation nachweisbar (Abb. 9).

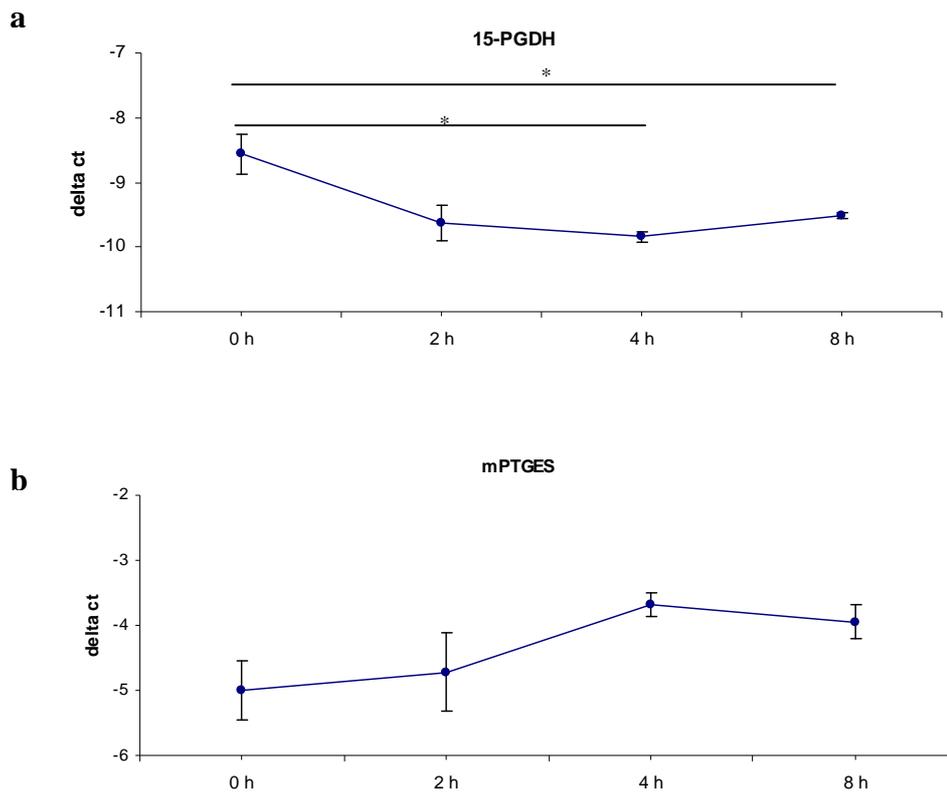


Abb. 9: 15-PGDH- und mPTGES-mRNA in stimulierten AEC II

Aus WT-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/ μ l) stimuliert und die relative Expression der 15-PGDH (a) und mPTGES (b) mRNA (Δ ct) nach 0, 2, 4 und 8 h per RT-PCR bestimmt (dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *=p<0,05).

3.3 Effekte von WY 14,643 in AEC II

Um den in der Literatur beschriebenen (Delerive 1999, Delayre-Orthez 2005) und in eigenen Studien (Schaefer 2008) bereits nachgewiesenen anti-inflammatorischen Effekt vom PPAR α -Aktivator WY 14,643 in der Lunge auch in isolierten AEC II zu überprüfen, wurden zwei verschiedene Applikationswege gewählt:

Einer Gruppe Versuchstiere wurde WY 14,643 für 14 Tage in einer Dosis von 1 mg/d oral verabreicht und anschließend die AEC II aus der Lunge isoliert (= *in vivo*-Behandlung (WY)). Bei einer anderen Gruppe wurde das WY 14,643 erst in die Zellkultur der isolierten AEC II in einer Konzentration von 100 μ M hinzugegeben (= *in vitro*-Behandlung (wy)). Bei einer dritten Gruppe wurden beide Applikationswege kombiniert angewendet (WY+wy).

Um den Signalweg des WY 14,643 über den PPAR α zu verdeutlichen, wurden alle Versuchsreihen in WT (Wildtyp, PPAR α +/+)- und PPAR α -KO (Knock-out, PPAR α -/-)-Tieren durchgeführt.

3.3.1 WY 14,643 hat keinen signifikanten Einfluss auf die COX-2-Expression in AEC II

Aus WT-Mäusen (mit oder ohne vorangegangene orale Behandlung mit WY 14,643 (\pm WY)) isolierte AEC II wurden kultiviert (mit oder ohne Zugabe von WY 14,643 (\pm wy)) und nach 36 h mit LPS (10 ng/ μ l) stimuliert. Nach 24 h Stimulation wurde der Versuch abgestoppt, die Zellen lysiert und die Proteinkonzentration im Lysat bestimmt. Anschließend wurden die intrazelluläre COX-1 und COX-2 im Western Blot quantifiziert.

Erwartungsgemäß zeigte sich nach LPS-Stimulation in allen untersuchten Gruppen ein Anstieg der COX-2-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Bei *in vitro*-Behandlung mit WY 14,643 (wy) war kein Unterschied der COX-2-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten. In den Gruppen mit *in vivo*-Behandlung mit WY 14,643 (WY und WY+wy) zeigte sich eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe geringere Expression, welche sich jedoch nicht als statistisch signifikant erwies (Abb. 10).

Ergebnisse

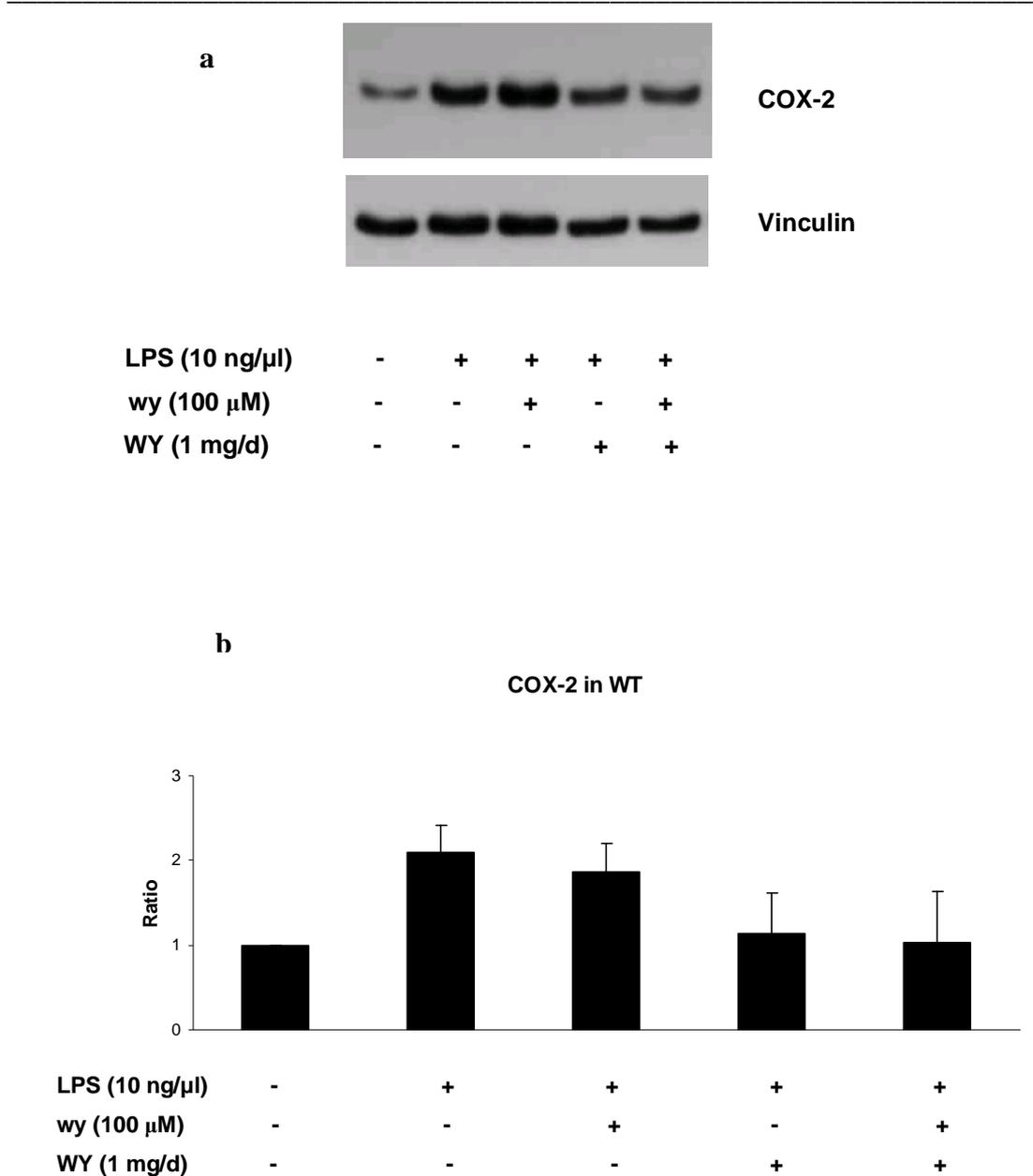
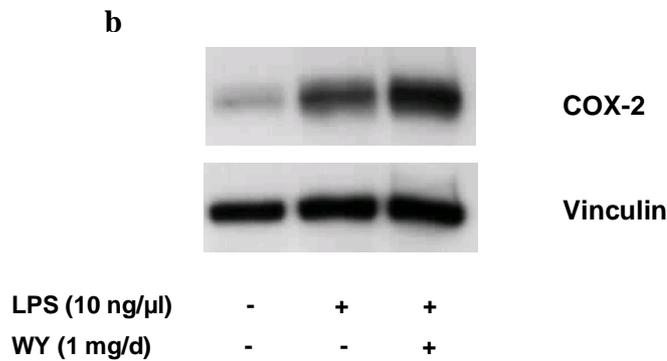
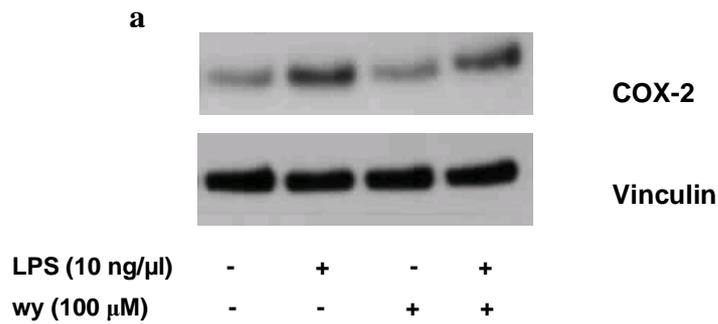


Abb. 10: COX-2-Expression in AEC II aus WT ± WY 14,643 im Western Blot

Aus WT-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/μl) stimuliert und die Expression des intrazellulären COX-2-Proteins nach 24 h im Western Blot dargestellt. Zur Ladungskontrolle wurde Vinculin nachgewiesen (a). WY 14,642 wurde *in vitro* (wy) (Balken 3), *in vivo* (WY) (Balken 4) oder kombiniert (Balken 5) appliziert und die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle (Balken 2) verglichen. Alle Werte wurden im Verhältnis zu einer unstimulierten Kontrolle (=1) betrachtet (Balken 1) (b) (dargestellt sind MW± SEM, n=4-7).

Ergebnisse

In AEC II aus PPAR α -KO-Mäusen stieg die COX-2-Expression nach 24 h LPS-Stimulation ebenfalls deutlich an. Es zeigte sich keine Beeinflussung der COX-2-Expression im Sinne einer anti-inflammatorischen Wirkung durch WY 14,643. In der Versuchsgruppe mit alleiniger *in vitro*-Behandlung (wy) konnte sogar eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe leicht verstärkte COX-2-Expression nachgewiesen werden (Abb. 11).



Ergebnisse

c

COX-2 in PPAR α -KO

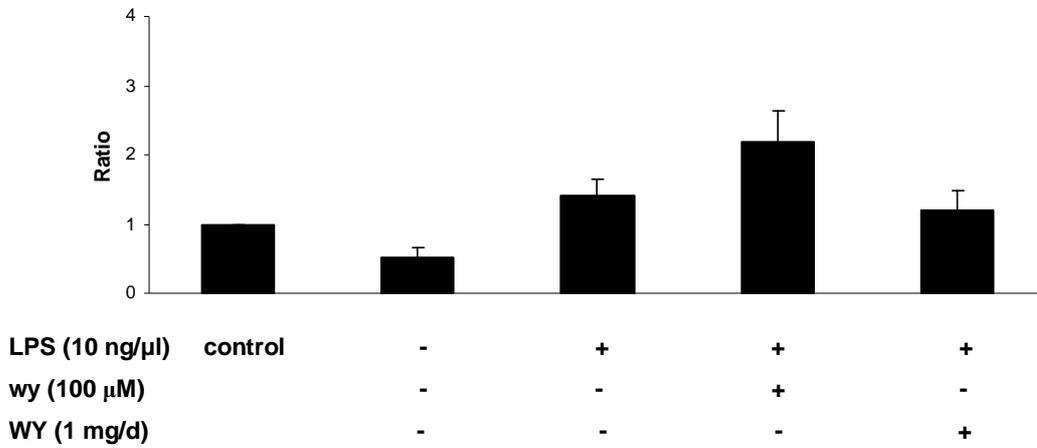


Abb. 11: COX-2-Expression in AEC II aus PPAR α -KO \pm WY 14,643 im Western Blot

Aus PPAR α -KO-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/ μ l) stimuliert und die Expression des intrazellulären COX-2-Proteins nach 24 h im Western Blot dargestellt. Zur Ladungskontrolle wurde Vinculin nachgewiesen. WY 14,642 wurde *in vitro* (wy) (a; c, Balken 4) oder *in vivo* (WY) (b; c, Balken 5) appliziert und die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle (c, Balken 3) verglichen. Alle Werte wurden im Verhältnis zu einer unstimulierten Kontrolle aus WT (=1) betrachtet (c, Balken 1) (c) (dargestellt sind MW \pm SEM, n=3-6).

Ergebnisse

Weder in AEC II aus WT- (Abb. 12) noch aus PPAR α -KO-Tieren (ohne Abbildung) hatte die *in vivo*- oder *in vitro*-Behandlung mit WY 14,643 einen Einfluss auf die Expression der COX-1 nach LPS-Stimulation für 24 h.

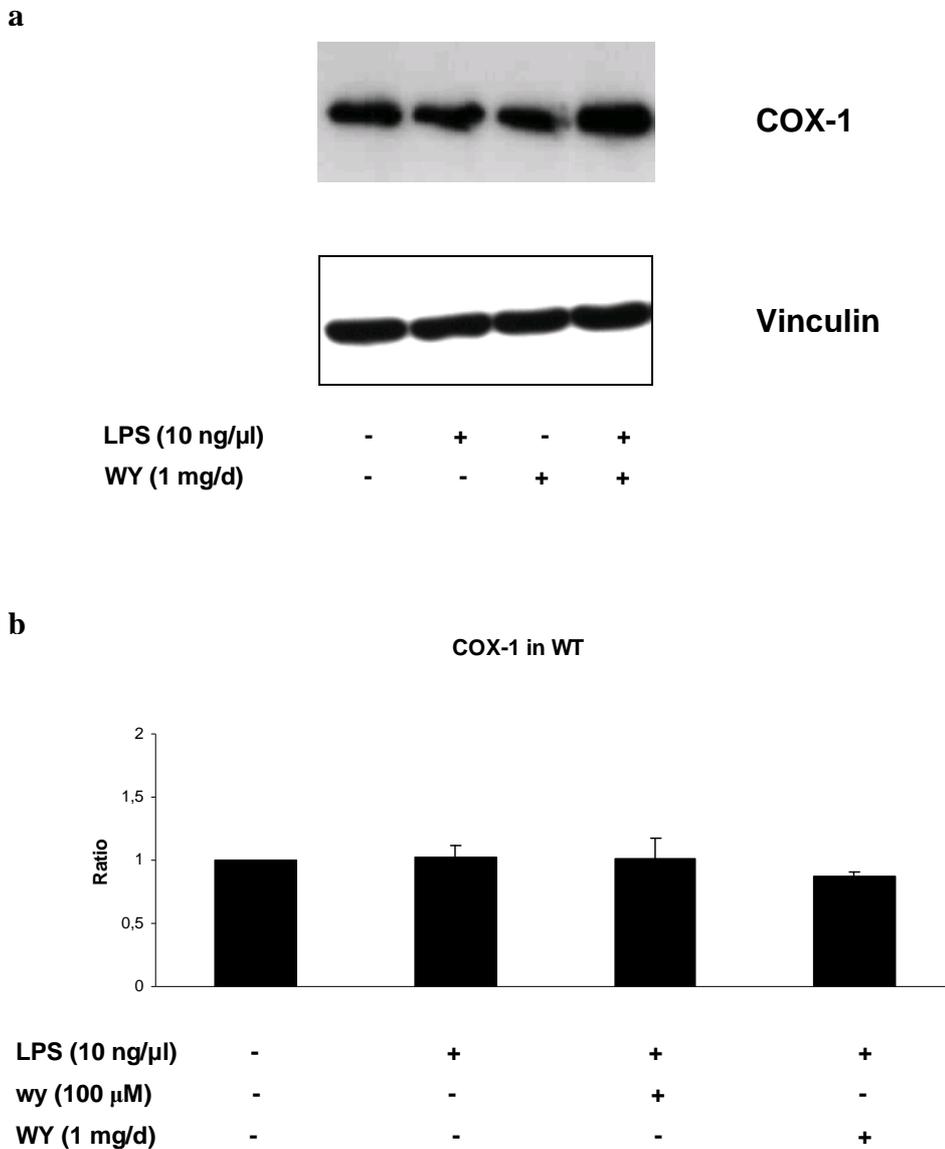


Abb. 12: COX-1-Expression in AEC II aus WT \pm WY 14,643 im Western Blot

Aus WT-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/ μ l) stimuliert und die Expression des intrazellulären COX-2-Proteins nach 24 h im Western Blot dargestellt. Zur Ladungskontrolle wurde Vinculin nachgewiesen (a). WY 14,642 wurde *in vitro* (wy) (Balken 3) oder *in vivo* (WY) (Balken 4) appliziert und die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle (Balken 2) verglichen. Alle Werte wurden im Verhältnis zu einer unstimulierten Kontrolle (=1) betrachtet (Balken 1) (b) (dargestellt sind MW \pm SEM, n=2-4).

Ergebnisse

3.3.2 WY 14,643 hat keinen nachweisbaren Effekt auf die PGE₂-Produktion in AEC II

AEC II aus WT wurden kultiviert und nach 36 h für 24 h mit LPS (10 ng/μl) stimuliert. Anschließend wurde die PGE₂-Konzentration im Überstand per ELISA quantifiziert. Dabei zeigte sich ein deutlicher Anstieg der PGE₂-Konzentration nach 24 h LPS-Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Weder Aktivierung des PPARα durch Zugabe von WY 14,643 *in vitro* (wy), noch die Verabreichung von WY 14,643 *in vivo* (WY) zeigte einen signifikanten Effekt auf die PGE₂-Produktion (Abb. 13).

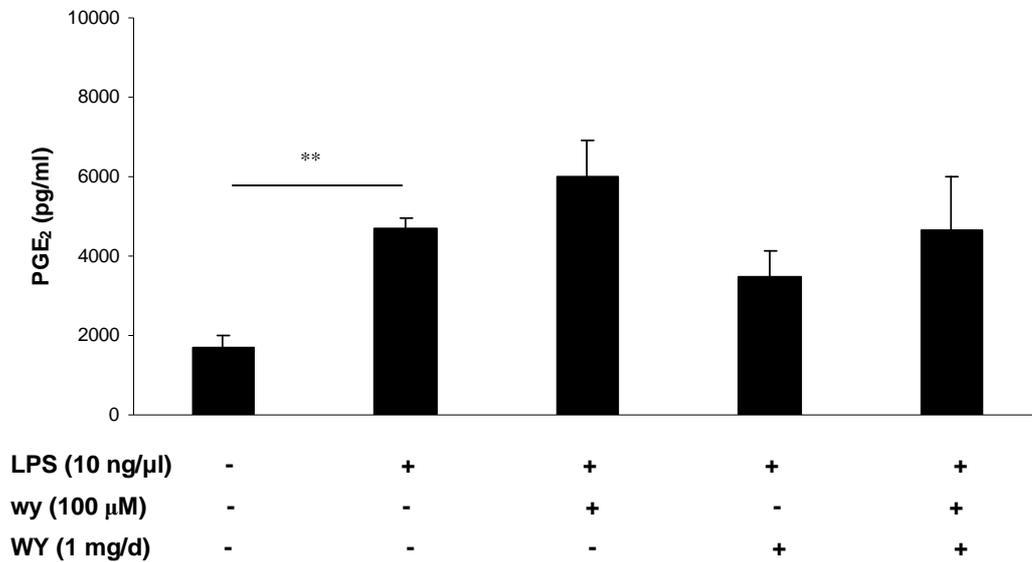


Abb. 13: PGE₂ im Überstand von AEC II aus WT ± WY 14,643

Aus WT-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/μl) stimuliert und die Konzentration von PGE₂ im Überstand nach 24 h per ELISA quantifiziert. WY 14,642 wurde *in vitro* (wy) (Balken 3), *in vivo* (WY) (Balken 4) oder kombiniert (Balken 5) appliziert und die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle (Balken 2) verglichen (dargestellt sind MW ± SEM, n=6-8, **=p<0,01 (unstimuliert vs. alle stimulierten Gruppen)).

Ergebnisse

Auch in der Zellkultur der AEC II aus PPAR α -KO kam es durch LPS-Applikation nach 24 h zu einem Anstieg der PGE₂-Konzentration im Überstand. Die Zugabe von WY 14,643 in die Zellkultur (wy) oder die Fütterung der Tiere mit WY 14,643 (WY) zeigte keinerlei Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 14).

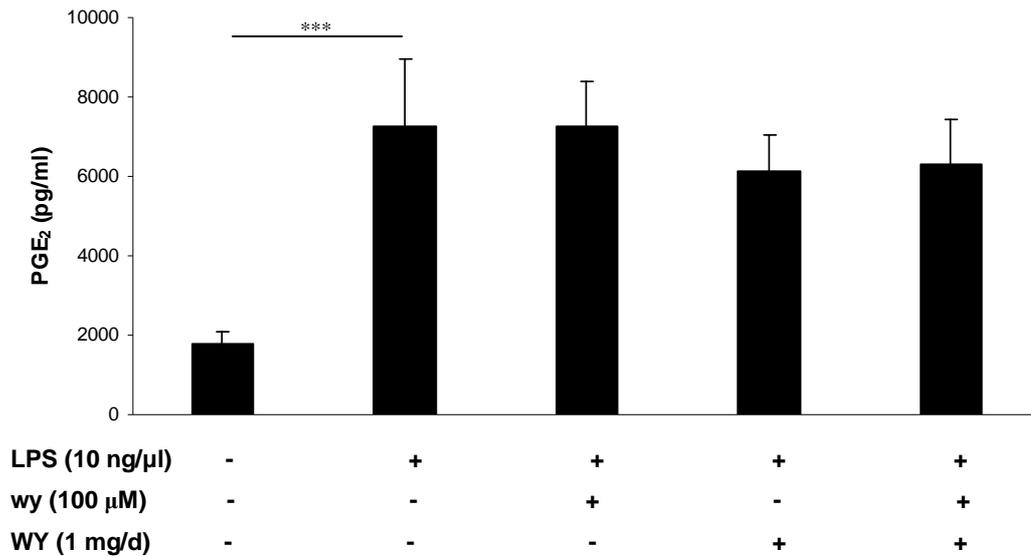


Abb. 14: PGE₂ im Überstand von AEC II aus PPAR α -KO \pm WY 14,643

Aus PPAR α -KO-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/μl) stimuliert und die Konzentration von PGE₂ im Überstand nach 24 h per ELISA quantifiziert. WY 14,643 wurde *in vitro* (wy) (Balken 3), *in vivo* (WY) (Balken 4) oder kombiniert (Balken 5) appliziert und die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle (Balken 2) verglichen (dargestellt sind MW \pm SEM, n=6-8, ***=p<0,001 (unstimuliert vs. alle stimulierten Gruppen)).

Ergebnisse

3.3.3 WY 14,643 vermindert in stimulierten AEC II bei *in vivo*-Behandlung den Anstieg der TxB₂-Produktion

In der AEC II-Kultur aus WT-Mäusen zeigte sich nach 24 h LPS-Stimulation ein deutlicher Anstieg der TxB₂-Konzentration im Überstand. Die Zugabe von WY 14,643 in die Zellkultur (wy) zeigte dabei keinen Effekt.

Dagegen war bei *in vivo*-Behandlung der Tiere mit WY 14,643 (WY) und auch bei kombinierter *in vivo*- und *in vitro*-Behandlung ein signifikant reduzierter Anstieg der TxB₂-Konzentration im Überstand nach LPS-Stimulation im Vergleich zur unbehandelten Gruppe nachweisbar (Abb. 15).

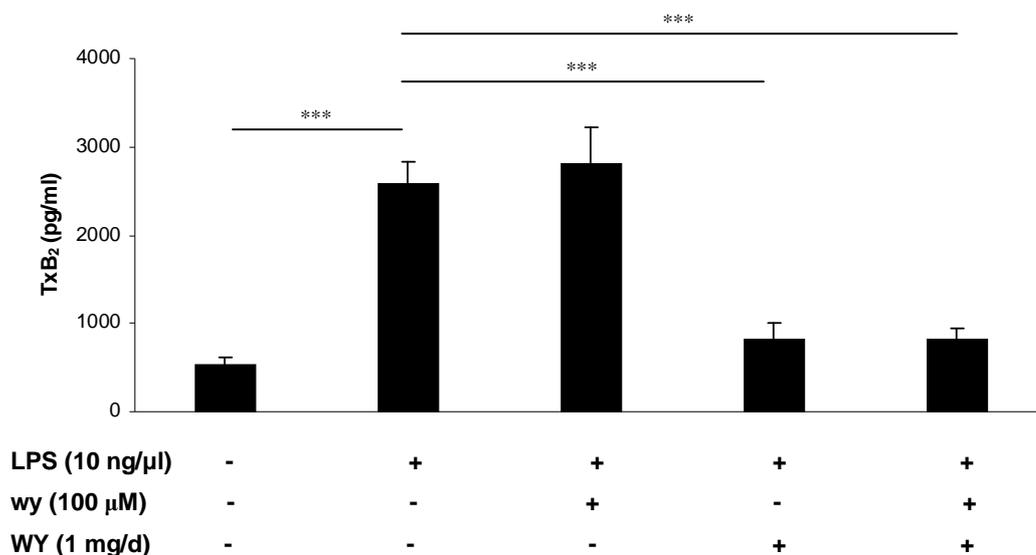


Abb. 15: TxB₂ im Überstand von AEC II aus WT ± WY 14,643

Aus WT-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/μl) stimuliert und die Konzentration von TxB₂ im Überstand nach 24 h per ELISA quantifiziert. WY 14,643 wurde *in vitro* (wy) (Balken 3), *in vivo* (WY) (Balken 4) oder kombiniert (Balken 5) appliziert und die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle (Balken 2) verglichen (dargestellt sind MW ± SEM, n=6-11, ***=p<0,001 (unstimuliert vs. LPS, unstimuliert vs. LPS+wy, LPS vs. LPS+WY, LPS vs. WY+wy)).

Ergebnisse

Bei aus PPAR α -KO-Mäusen isolierten AEC II war ebenfalls ein deutlicher Anstieg der TxB₂-Konzentration im Überstand nach 24 h LPS-Stimulation zu beobachten. Die Behandlung mit WY 14,643 zeigte keinerlei Effekt (Abb. 16).

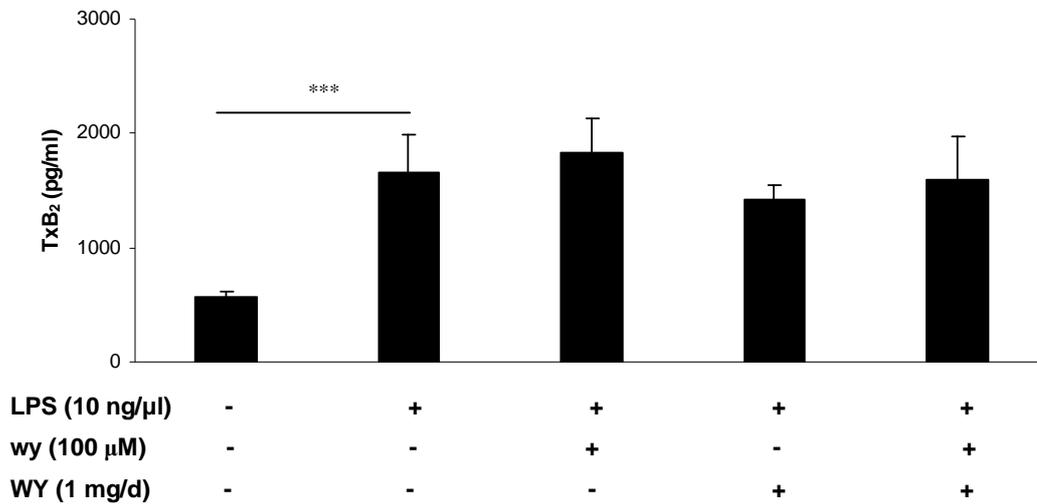


Abb. 16: TxB₂ im Überstand von AEC II aus PPAR α -KO \pm WY 14,643

Aus PPAR α -KO-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/μl) stimuliert und die Konzentration von TxB₂ im Überstand nach 24 h per ELISA quantifiziert. WY 14,643 wurde *in vitro* (wy) (Balken 3), *in vivo* (WY) (Balken 4) oder kombiniert (Balken 5) appliziert und die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle (Balken 2) verglichen (dargestellt sind MW \pm SEM, n=5-9, ***=p<0,001 (unstimuliert vs. alle stimulierten Gruppen)).

Ergebnisse

3.3.4 WY 14,643 vermindert in AEC II bei *in vivo*-Behandlung die Produktion proinflammatorischer Zytokine

3.3.4.1 TNF- α

Die Produktion von TNF- α in kultivierten AEC II aus WT-Mäusen zeigt nach 24 h Stimulation mit LPS einen deutlichen Anstieg im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (Abb. 7, Abb. 17).

Bei vorangegangener *in vivo*-Behandlung der Mäuse mit WY 14,643 (WY) war dieser Anstieg signifikant vermindert. Durch zusätzliche *in vitro*-Behandlung konnte ein additiver Effekt erzielt und die TNF- α -Produktion im Vergleich zur alleinigen *in vivo*-Behandlung nochmals reduziert werden. Die alleinige *in vitro*-Applikation von WY 14,643 erbrachte keinen nachweisbaren Effekt (Abb. 17).

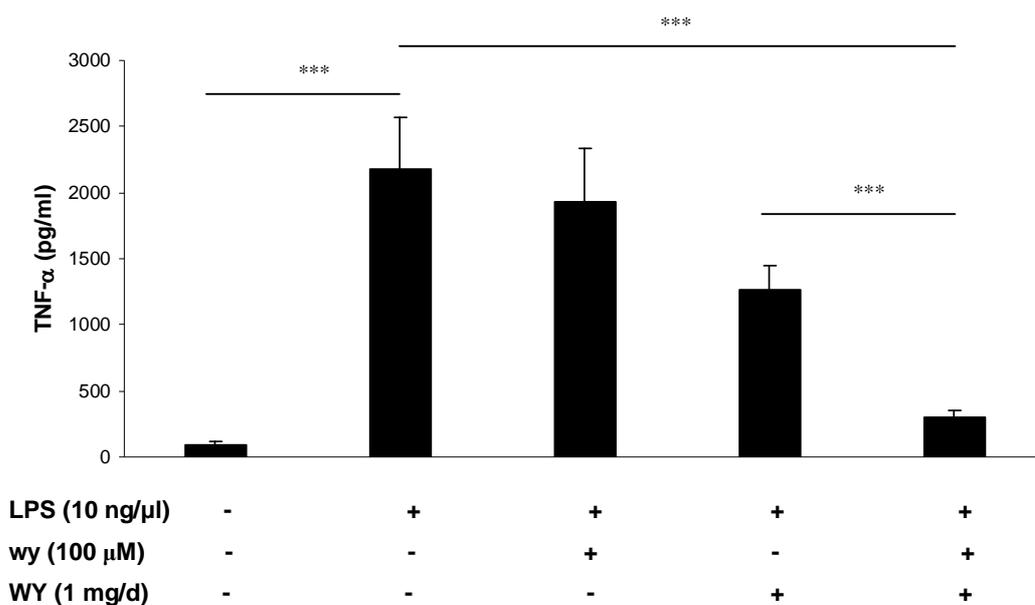


Abb. 17: TNF- α im Überstand von AEC II aus WT \pm WY 14,643

Aus WT-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/μl) stimuliert und die Konzentration von TNF- α im Überstand nach 24 h per ELISA quantifiziert. WY 14,643 wurde *in vitro* (wy) (Balken 3), *in vivo* (WY) (Balken 4) oder kombiniert (Balken 5) appliziert und die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle (Balken 2) und untereinander verglichen (dargestellt sind MW \pm SEM, n=6-9, ***=p<0,001 (unstimuliert vs. LPS, LPS vs. LPS+WY, LPS vs. WY+wy, LPS+WY vs. LPS+WY+wy)).

Ergebnisse

Die Konzentration von TNF- α im Mediumsüberstand der AEC II-Kultur aus PPAR α -KO stieg nach 24 h LPS-Stimulation ebenfalls signifikant an. Die Behandlung mit WY 14,643 hatte darauf keinerlei Einfluss (Abb. 18).

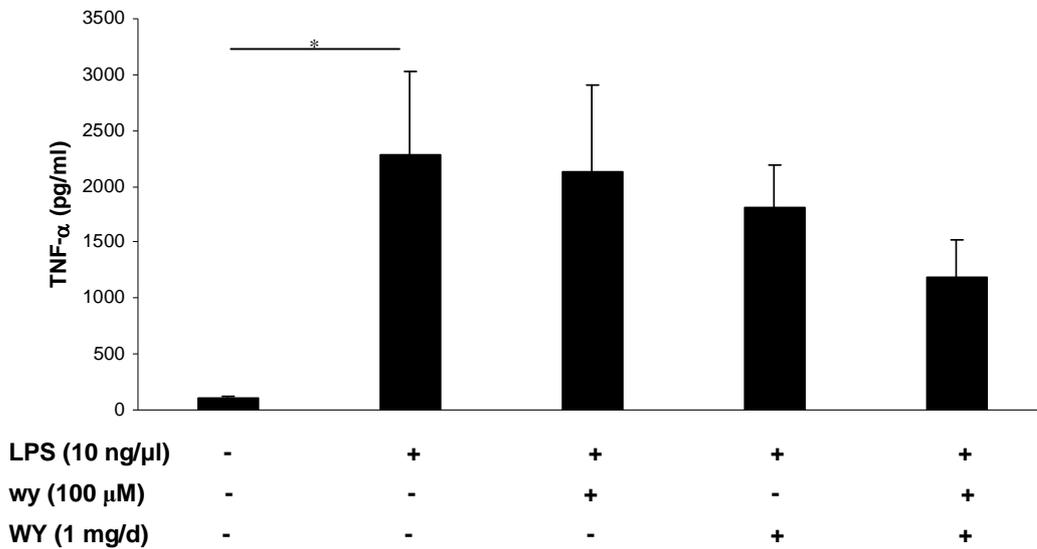


Abb. 18: TNF- α im Überstand von AEC II aus PPAR α -KO \pm WY 14,643

Aus PPAR α -KO-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/μl) stimuliert und die Konzentration von TNF- α im Überstand nach 24 h per ELISA quantifiziert. WY 14,643 wurde *in vitro* (wy) (Balken 3), *in vivo* (WY) (Balken 4) oder kombiniert (Balken 5) appliziert und die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle (Balken 2) verglichen (dargestellt sind MW \pm SEM, n=4-9, *=p<0,05 (unstimuliert vs. alle stimulierten Gruppen)).

Ergebnisse

3.3.4.2 MIP-2

Bei Messung von MIP-2 im Überstand war bei AEC II aus WT-Tieren eine stark erhöhte Konzentration nach Stimulation mit LPS für 24 h im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe zu verzeichnen. Die *in vivo*-Behandlung der Tiere mit WY 14,643 (WY) führte zu einer signifikant verminderten MIP-2-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die alleinige *in vitro*-Applikation von WY 14,643 (wy) zeigte keinen deutlichen Effekt, wohingegen die kombinierte *in vivo*- und *in vitro*-Behandlung zu einer nochmals reduzierten MIP-2-Konzentration im Vergleich zur alleinigen *in vivo*-Behandlung führte (Abb. 19).

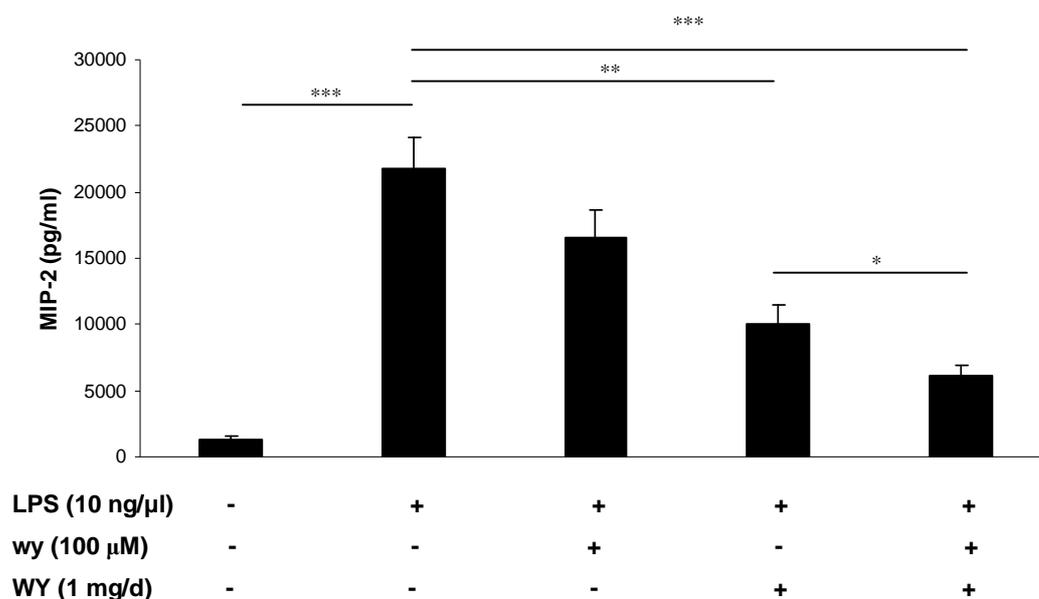


Abb. 19: MIP-2 im Überstand von AEC II aus WT \pm WY 14,643

Aus WT-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/μl) stimuliert und die Konzentration von MIP-2 im Überstand nach 24 h per ELISA quantifiziert. WY 14,643 wurde *in vitro* (wy) (Balken 3), *in vivo* (WY) (Balken 4) oder kombiniert (Balken 5) appliziert und die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle (Balken 2) und untereinander verglichen (dargestellt sind MW \pm SEM, n=6-10, * = p < 0,05 (LPS+WY vs. LPS+WY+wy), ** = p < 0,01 (LPS vs. LPS+WY), *** = p < 0,001 (unstimuliert vs. alle stimulierten Gruppen, LPS vs. LPS+WY+wy)).

Ergebnisse

Im Mediumsüberstand der AEC II-Kultur aus PPAR α -KO-Mäusen stieg die MIP-2-Konzentration nach LPS-Stimulation deutlich an. Die Behandlung mit WY 14,643 zeigte diesbezüglich keinen signifikant nachweisbaren Effekt (Abb. 20).

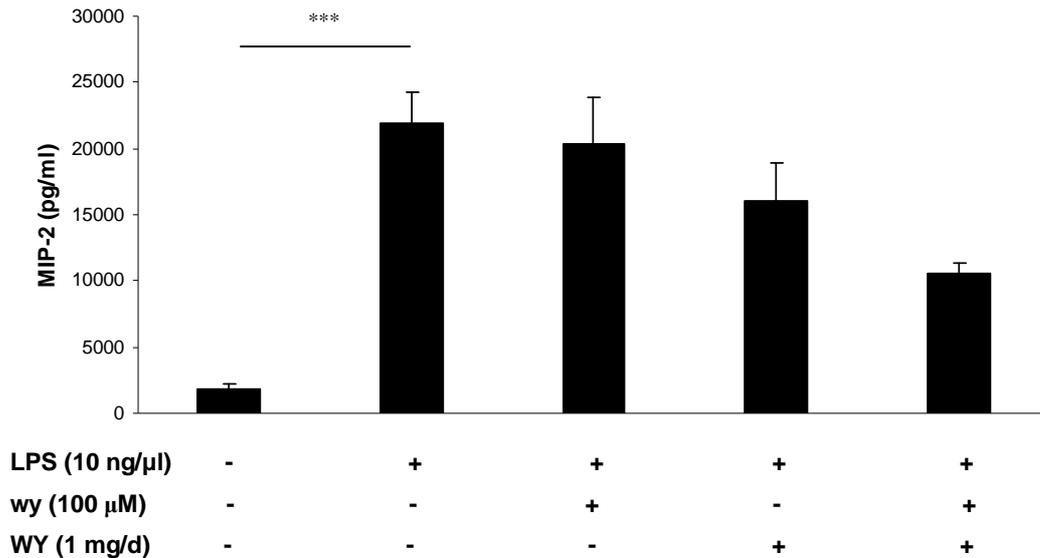


Abb. 20: MIP-2 im Überstand von AEC II aus PPAR α -KO \pm WY 14,643

Aus PPAR α -KO-Mäusen isolierte und kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/μl) stimuliert und die Konzentration von MIP-2 im Überstand nach 24 h per ELISA quantifiziert. WY 14,643 wurde *in vitro* (wy) (Balken 3), *in vivo* (WY) (Balken 4) oder kombiniert (Balken 5) appliziert und die Ergebnisse mit der unbehandelten Kontrolle (Balken 2) verglichen (dargestellt sind MW \pm SEM, n=5-9, ***=p<0,001 (unstimuliert vs. alle stimulierten Gruppen)).

Ergebnisse

3.4 PPAR α -Expression in der Gesamtlunge und in isolierten AEC II

Die Expression von PPAR α -mRNA wurde in Lungenhomogenisat und in isolierten AEC II untersucht. WT-Mäuse wurden intratracheal mit LPS (10 μ g) stimuliert und die nach 2, 4, 8, 12 und 24 h isolierten Lungen homogenisiert. Nach 12 h Stimulationszeit zeigte sich ein deutlicher Anstieg der PPAR α -mRNA-Expression (Abb. 21 a).

Isolierte und kultivierte AEC II wurde ebenfalls mit LPS (10 ng/ μ l) stimuliert und die PPAR α -mRNA-Expression nach 2, 4, 8, 12 und 24 h Stimulationszeit per RT-PCR bestimmt. Die Konzentration der mRNA blieb hier unbeeinflusst von der LPS-Stimulation (Abb. 21 b).

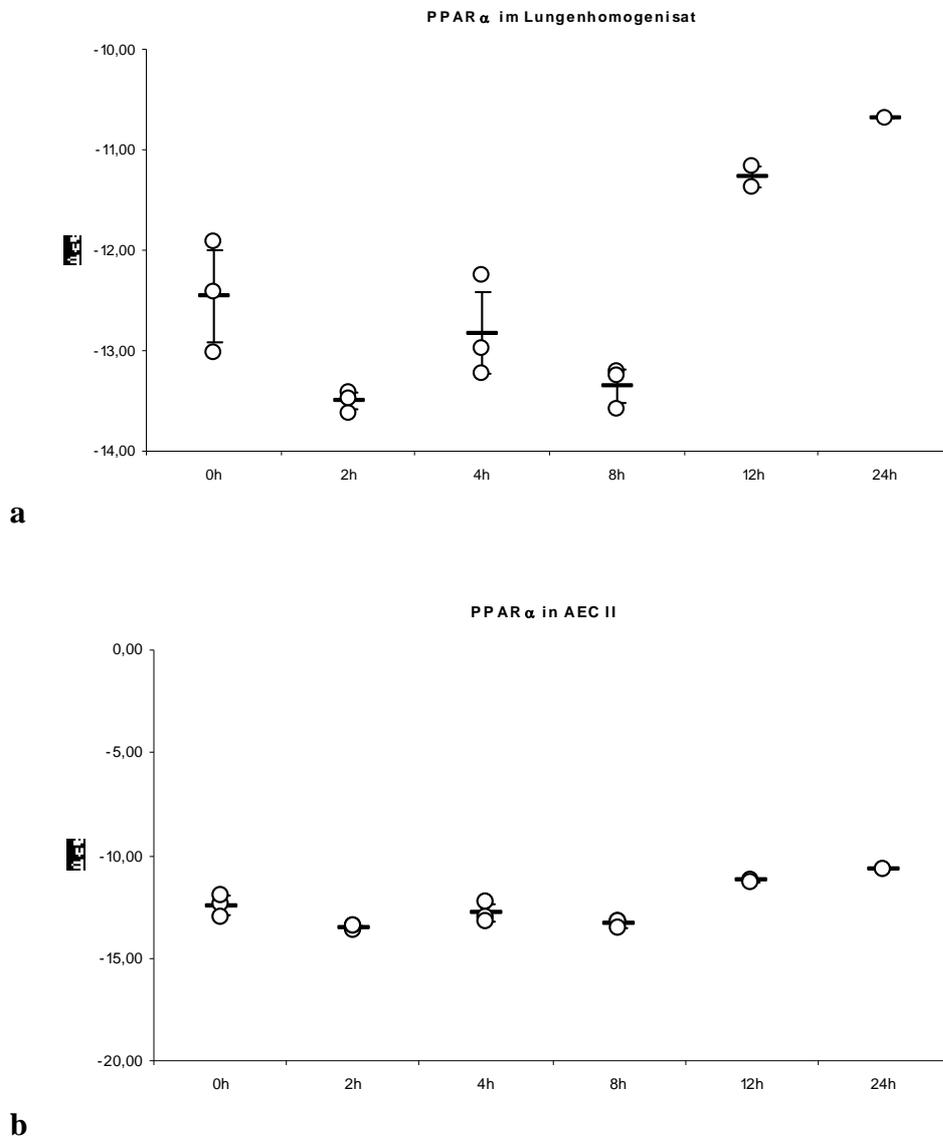


Abb. 21: PPAR α -Expression in Lungenhomogenisat und isolierten AEC II

Ergebnisse

WT-Mäusen wurde LPS (10 µg) intratracheal appliziert, die Lunge nach 2, 4, 8, 12 oder 24 h (Kontrollgruppe: 0 h) entnommen und homogenisiert. Die relative Expression der PPAR α -mRNA (Δ ct) im Homogenisat wurde per RT-PCR quantifiziert (a).

Aus WT-Mäusen isolierte und für 36 h kultivierte AEC II wurden mit LPS (10 ng/µl) stimuliert und die relative Expression der PPAR α -mRNA (Δ ct) nach 2, 4, 8, 12 und 24 h per RT-PCR bestimmt (b).

4. DISKUSSION

4.1 Alveolarepithelzellen (AEC) Typ II im ARDS

Das ARDS gehört, wie bereits eingangs erwähnt (siehe Abschnitt 1.1.1), zu den häufigsten Ursachen für das Versterben von Patienten auf Intensivstationen. Die Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich dabei bislang auf konservative Massnahmen wie u.a. lungenprotektive Beatmung, restriktives Flüssigkeitsmanagement und supportive Therapien (z.B. Thrombembolieprophylaxe, adäquate parenterale Ernährung etc.) (Hecker et al. 2008).

In der Pathophysiologie des akuten Lungenversagens spielt die Schädigung der endothelialen, vor allem aber auch der epithelialen Integrität durch oxidativen Stress und vermehrte Proteaseaktivität eine entscheidende Rolle. Sie bewirkt die Entstehung eines proteinreichen alveolären Ödems und den Einstrom pro-inflammatorischer Zellen in die Alveole. Besonders die Schädigung der AEC II trägt hier zur Aggravierung der Symptomatik bei: zum Einen wird durch die verminderte Surfactantaktivität die Bildung von Atelektasen begünstigt, zum Anderen trägt die reduzierte alveoläre *fluid clearance* zur weiteren Akkumulation von extravasaler Flüssigkeit in der Lunge bei, was in Folge mit einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet ist. Auch entsteht durch den Defekt der epithelialen Barriere ein erhöhtes Risiko für schwere septische Verläufe durch das Eindringen bakterieller Komponenten in den Blutkreislauf (Ware and Matthay 2000, Ware und Matthay 2001, Fang et al. 2010, Wheeler und Bernard 2007). Aus diesen Gründen muss die Analyse des Verhaltens der AEC II während einer pulmonalen Inflammation sowie die Evaluation möglicher therapeutischer Ansatzpunkte von gesteigertem Interesse sein.

Da die verminderte Surfactant-Aktivität durch Schädigung der produzierenden AEC II eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Progredienz des ALI/ARDS spielt, stellt die Applikation von Surfactant einen logischen therapeutischen Ansatz dar. Seit Ende der 1980er Jahre wurden auf diesem Gebiet zahlreiche Studien durchgeführt, erstmals von Richman et al. 1989 (Richman et al. 1989). Bei dem in Frühgeborenen auftretenden neonatalen akuten Lungenversagen konnte die Wirksamkeit von inhalativer Surfactant-Gabe nachgewiesen werden (Long et al. 1991). Auch im ALI bei Kindern zeigte sich eine signifikant reduzierte Mortalität und verbesserte Oxygenierung durch exogenes Surfactant (Willson et al. 2005). Dagegen weisen die bisherigen klinischen Studien zur Surfactantgabe im ARDS des Erwachsenen eine enttäuschende Bilanz auf: während sich in Phase I und II der

Diskussion

Untersuchungen häufig eine positive Therapietendenz im Sinne einer verbesserten pulmonalen Funktion und reduzierten Mortalität zeigte (Spragg et al. 1994, Walmrath et al. 1996, Walmrath et al. 2002), konnte in Phase III-Studien der Nutzen der Surfactanttherapie weder bei inhalativer (Anzueto et al. 1996) noch bei bronchoskopischer Administration (Spragg et al. 2004) bestätigt werden.

Auch andere inhalative Therapien mit z.B. Prostacyclin (= Prostaglandin I₂) (Walmrath et al. 1993), Stickstoffmonoxid (NO) (Dellinger et al. 1998, Adhikari et al. 2007) und β_2 -Sympathomimetika (Matthay et al. 2011) sowie intravenöse Therapien mit u.a. Prostaglandin E1 (Abraham et al. 1999, Vincent et al. 2001), Glukokortikoiden (Steinberg et al. 2006) oder aktiviertem Protein C (Liu et al. 2008) erschienen in präklinischen Fallstudien bei Patienten mit ALI oder ARDS meist vielversprechend, erwiesen sich dann aber in der klinischen Anwendung als nicht empfehlenswert.

Aktuell werden u.a. Simvastatin und Therapien mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) hinsichtlich ihrer Wirksamkeit im ALI/ARDS untersucht. Interessanterweise zeigte sich bei endobronchialer Administration von MSC ca. 1 h nach pulmonaler Schädigung durch Endotoxin an isolierten humanen Lungen eine nahezu vollständige Normalisierung der Gefäßpermeabilität und ein Rückgang der extravasalen Flüssigkeit auf Normalniveau (Matthay et al. 2010, Gotts und Matthay 2011).

Trotz intensiver Forschung und der o.g. Vielzahl klinischer Studien ist es bislang nicht gelungen, eine suffiziente pharmakologische Therapie für das ALI/ARDS zu entwickeln und zu etablieren.

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es daher, die bekannte anti-inflammatorische Wirkung von Fibraten über den PPAR α in isolierten AEC II darzustellen und so ihr mögliches Potential als Medikation im akuten Lungenversagen zu überprüfen.

Die Isolation von primären AEC II aus Mäuselungen durch Negativ-Selektion über Streptavidin-gekoppelte und mit Antikörpern gegen zelluläre Oberflächenantigene verbundene magnetische *beads* stellt ein etabliertes Verfahren zur Gewinnung muriner epithelialer Lungenzellen für *in vitro*-Versuche dar (Corti et al. 1996, Herold 2006).

Ein wesentlicher Aspekt bei der Arbeit mit primären Zellkulturen ist die gewählte Isolationszeit. Insbesondere bei primären AEC II ist zu beachten, dass bei einer längeren Kulturzeit im Verlauf eine vermehrte Umdifferenzierung von AEC II in AEC I stattfindet, je nach Literatur nach 48 bis 120 h (Diglio und Kikkawa 1977, Dobbs 1990, Corti et al. 1996).

Deshalb wurde von unserer Gruppe eine verhältnismäßig kurze Kulturzeit von gerade einmal 36 h bevorzugt und eine gegebenenfalls verminderte Reinheit der Zellkultur in Kauf genommen.

Alternativ liessen sich Versuche zum Verhalten epithelialer Lungenzellen auch mit der humanen Lungenadenokarzinom-Tumorzelllinie A549 durchführen, deren physiologische Eigenschaften sich jedoch von denen primärer epithelialer Lungenzellen, besonders hinsichtlich Zellarchitektur, Barriereigenschaften und Differenzierungspotenzial unterscheiden (Fuchs et al. 2003). Durch die Verwendung primärer Zellkulturen lässt sich ein wesentlich genaueres und den physiologischen Gegebenheiten der Lunge entsprechendes Bild darstellen.

4.2 Entzündungsreaktion in AEC II

Zum Auslösen einer entzündlichen Reaktion in AEC II wurde im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit der natürliche Stimulus Lipopolysaccharid (LPS), ein Wandbestandteil gram-negativer Bakterien, gewählt. Dies geschah vor allem mit Hinblick auf die möglichst realistische Imitation einer bakteriellen pulmonalen Infektion, wie sie häufig im Rahmen eines ALI/ARDS vorliegt. Andernfalls wären alternative, inflammatorisch wirksame Stimulanzen, wie z.B. TNF- α oder IL-1 β , in Betracht zu ziehen gewesen.

Im Hinblick auf die Übertragung der beobachteten Ergebnisse auf das Krankheitsbild des ALI/ARDS ist natürlich zu beachten, dass sich das im Versuchsaufbau verwandte „*single-hit*-Modell“ durch einen einzelnen und einmaligen Entzündungstrigger ganz offensichtlich vom Ablauf einer natürlichen pulmonalen Entzündung unterscheidet. Diese ist häufig durch das Zusammenspiel mehrerer auslösender Faktoren gekennzeichnet, welche in Intensität und Dauer sehr variabel sein können. Auch unterscheidet sich die Reaktion der AEC II in der isolierten Zellkultur möglicherweise von ihrem Verhalten im intakten Zellverband der Alveole. Dort sind die lokalen Alveolarmakrophagen, Leukozyten und Endothelzellen ebenfalls an Entstehung und Auflösung der Entzündungsreaktion beteiligt.

Nichtsdestotrotz handelt es sich bei dem gewählten Versuchsaufbau um ein von vielen Gruppen verwendetes, etabliertes Modell, dessen Vorteile insbesondere in der guten Reproduzierbarkeit und auch in der dadurch entstehenden Vergleichbarkeit mit vorausgegangenen Studien liegen.

Diskussion

Zur Wahl der optimalen Dosierung des LPS waren in Vorversuchen Dosisreihen mit 1, 10 und 20 ng/ μ l LPS als Stimulanz angefertigt worden und die Steigerung der intrazellulären COX-2-Expression in AEC II per Western Blot als Parameter für eine aktive entzündliche Reaktion gemessen worden. Dabei hatte sich eine Dosierung von 10 ng/ μ l als suffizient erwiesen.

Ein wesentlicher früher Zwischenschritt bei Ablauf einer zellulären Entzündungsreaktion unterschiedlichster Genese ist die Aktivierung von NF- κ B (nukleärer Faktor κ B). Dieser fungiert, nach seiner Aktivierung im Zytoplasma und anschließender Translokation in den Zellkern, als Transkriptionsfaktor und initiiert die Transkription verschiedenster proinflammatorischer Gene, deren Produkte für den Ablauf der Entzündungskaskade relevant sind (z.B. TNF- α , IL-1 β etc.) (Tak and Firestein 2001). Der Nachweis des aktiven NF- κ B ist deshalb ein etablierter Beleg für den Beginn einer akuten Entzündungsreaktion. Seit einiger Zeit ist der Western Blot zum Nachweis der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges anerkannt. Hierdurch können sowohl das bei Aktivierung phosphorylierte NF- κ B-Protein (Phospho-NF- κ B), als auch das Inhibitorprotein I κ B α schnell und valide dargestellt werden (Senftleben et al. 2001, Chen et al. 2011, Ghashghaieina et al. 2011).

In unserem LPS-induzierten Entzündungsmodell in isolierten AEC II waren bereits nach wenigen Minuten die ersten Reaktionen nachweisbar. Es zeigte sich schon nach 5 min Stimulationsdauer ein Anstieg der Expression des aktivierten NF- κ B (= Phospho-NF- κ B), welche nach 1 h Stimulationszeit ihr Maximum erreichte und nach 4 h wieder abfiel. Die Konzentration des Inhibitorproteins I κ B α hatte einen der NF- κ B-Expression entgegengesetzten Verlauf: seine Expression fiel nach 15 min Stimulation gegenüber dem Kontrollniveau ab, erreichte sein Minimum nach 30 min und begann dann langsam wieder anzusteigen. Diese Beobachtungen sind analog zu den Daten anderer Gruppen – so konnten z.B. Yan et al. in humanen Amnionmesenchymzellen nach IL-1 β -Stimulation einen ähnlichen Zeitverlauf für I κ B α zeigen. Hier war bereits nach 5 min Stimulationsdauer ein Abfall der Konzentration ersichtlich. Das Minimum war ebenfalls nach 30 min erreicht, während nach 120 min die I κ B α -Konzentration wieder auf Ausgangsniveau angestiegen war (Yan et al. 2002).

Die Expression der COX-2-mRNA erreichte in unseren Versuchen in AEC II ihr Maximum 2 h nach Stimulationsbeginn. Die Expression des COX-2-Proteins blieb nach LPS-Stimulation für mindestens 24 h konstant gegenüber dem Kontrollniveau erhöht.

Diskussion

Auch die Konzentrationen der im Überstand gemessenen Zytokine (TNF- α , MIP-2) und Prostaglandine (PGE₂, TxB₂) begannen nach 2 h Stimulationsdauer langsam und kontinuierlich anzusteigen. Es ist bekannt, dass TNF- α zu den frühen Mediatoren einer Entzündung zählt und seine Produktion besonders in der Frühphase der inflammatorischen Reaktion gesteigert ist (Simpson und Casey 1989). Während die TNF- α -Produktion nach 4-8 h ein *peak* erreichte und danach wieder abfiel, zeigte sich für TxB₂ und MIP-2 auch nach 24 h Stimulationsdauer weiter ein kontinuierlicher Anstieg.

Für die microsomale PGES-1 (mPGES-1), einem Enzym der PGE₂-Synthesekette, wäre anhand der bisherigen Datenlage zu erwarten gewesen, dass sie sich analog der COX-2 verhält und durch LPS-Stimulation induzierbar ist. In murinen Peritonealmakrophagen hatten Uematsu et al. eine Induzierbarkeit der mPGES nach 8 h LPS-Stimulation (mit 100 ng/ml) nachweisen können (Uematsu et al. 2002). In der Mausmakrophagenzelllinie RAW264.7 zeigten Diaz-Munoz et al. eine simultane Hochregulation der COX-2- und mPGES-1-mRNA nach 3, 8 und 24 h LPS-Stimulation (1 μ g/ml) (Diaz-Munoz et al. 2010). Dies ließ sich in unseren Versuchen nicht bestätigen. Eine signifikante Hochregulation der mPGES-1-mRNA in AEC II war, im Gegensatz zur COX-2-mRNA, nach 2, 4 und 8 h LPS-Stimulation nicht nachweisbar. Möglicherweise ist die Regulation der mPGES-1 in AEC II also anders gelagert als in anderen Zelltypen.

Hingegen zeigte die Expression der 15-PGDH-mRNA, einem Enzym für den Abbau des PGE₂, eine deutliche Herunterregulation nach 4- und 8-stündiger LPS-Stimulation. Der in Folge verminderte Abbau von PGE₂ begünstigt die Aufrechterhaltung der Inflammation. Tong et al. hatten bereits ähnliche Effekte auf die 15-PGDH bei Stimulation mit Zytokinen (IL-1 β und TNF- α) in der humanen Lungenadenokarzinomzelllinie A549 nachweisen können (Tong et al. 2006).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass es bei einer Entzündungsreaktion in AEC II zu einer Vielzahl von Reaktionskaskaden kommt, von denen die ersten (z.B. Aktivierung von NF- κ B) bereits nach wenigen Minuten zur Aktivierung der Transkription pro-inflammatorischer Gene führen. Nach einigen Stunden lassen sich dann die entsprechenden Produkte, nämlich die entstandenen Proteine (z.B. COX-2), nachweisen.

4.3 Fibrate in Lungenerkrankungen

Bei der Suche nach suffizienten pharmakologischen Therapieoptionen für Lungenerkrankungen im Allgemeinen und für das ALI/ARDS im Speziellen sind Fibrate seit einigen Jahren von gesteigertem Interesse. Über die Aktivierung des PPAR α und eine nachfolgende Reaktionskette können sie eine potente anti-inflammatorische Wirkung entwickeln. Beim Einsatz im Mausmodell konnten Schäfer et al. zeigen, dass die prä-experimentelle *in vivo*-Fütterung von Mäusen mit WY 14,643 beim ALI nach intratrachealer LPS-Gabe zu einer Verminderung der Leukozyteninvasion sowie von Protein- und Zytokinkonzentrationen (TNF- α , MIP-2) in der BAL führt (Schaefer et al. 2008). Bei der PAF-induzierten vaskulären *leakage* konnte hier ebenfalls ein protektiver Effekt durch das Fibrat nachgewiesen werden. Auch im murinen Modell des allergischen Asthmas zeigten sich vielversprechende Tendenzen hinsichtlich der anti-inflammatorischen Wirkung von WY 14,643 – auch hier führte die *in vivo*-Behandlung u.a. zu einer verminderten Aktivierung von Th2-Zellen und in der Folge zu einer verminderten Expression pro-inflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-5, TNF- α , MIP-2 und MCP-1) in der BAL (Delayre-Orthez et al. 2008). Bei chronischen Lungenerkrankungen scheint die Aktivierung des PPAR α ebenfalls eine Rolle zu spielen: in Lymphozyten von Patienten mit Mukoviszidose (*cystic fibrosis*, CF) wurde eine signifikant verminderte PPAR α -Expression gemessen (Reynders et al. 2006), während in Tiermodell des Bleomycin-induzierten Lungenversagens eine deutliche Reduktion des Ausmasses durch PPAR α -Aktivierung erreicht werden konnte (Genovese et al. 2005).

4.4 Effekte von Fibraten in AEC II

Bisherige Studien hatten eine anti-inflammatorische Wirkung der Fibrate im ARDS/ALI in der Gesamtlunge nachweisen können, ohne jedoch deren Angriffsort genauer klären zu können. In der vorliegenden Arbeit sollte nun gezielt der Effekt des Fibrats WY 14,643 in isolierten AEC II untersucht werden. Ziel war es, die *in vivo*-Gabe des Fibrats (mit 14-tägiger oraler Vorbehandlung der Mäuse) mit einer *in vitro*-Applikation von WY 14,643 in die Zellkultur der isolierten AEC II zu vergleichen. Untersucht wurde die Auswirkung auf die Expression der COX-1 und -2, sowie auf die Produktion von PGE₂, TxB₂, TNF- α und MIP-2.

Diskussion

Zu konstatieren ist, dass die alleinige *in vitro*-Applikation von WY 14,643 in die Zellkultur bei allen von uns untersuchten Parametern keinen nachweisbaren Effekt auf die Entzündungsreaktion der AEC II zeigte. Ursächlich dafür könnten zwei verschiedene Faktoren sein: die gewählte Dosierung des Fibrats einerseits und die Expression des PPAR α , also des erforderlichen Rezeptors, in den AEC II andererseits.

Anhand der vorliegenden Literatur hatten wir uns bei der Planung der *in vitro*-Experimente für eine Dosierung des WY 14,643 von 100 μ M entschieden. Die in der Literatur beschriebenen anti-entzündlichen Effekte von WY 14,643 bei *in vitro*-Applikation in verschiedenen Zellkulturen und in unterschiedlichen Konzentrationen sind vielfältig und z.T. widersprüchlich: in humanen Makrophagen liess sich eine Reduktion der PAF (*platelet activating factor*)-Bindung und der PAF-Rezeptor-mRNA-Expression durch WY 14,643 bereits bei einer Konzentration von 20 μ M nachweisen (Hourton et al. 2001). Paukkeri et al. zeigten eine verminderte iNOS-Expression und NO-Produktion durch WY 14,643 (100 μ M) in LPS-stimulierten humanen Makrophagen (Paukkeri et al. 2007).

In humanen Endothelzellen bewirkte WY 14,643 bei Zytokinstimulation dosisabhängig eine reduzierte VCAM-1-Expression mit einem Wirkungsoptimum bei 100 μ M (Marx et al. 1999). Bei einer Dosierung von 250 μ M fanden Delerive et al. einen inhibitorischen Effekt auf IL-1-induzierte IL-6-Genexpression in humanen aortalen glatten Muskelzellen (Delerive et al. 1999), während in mit IL-1 β stimuliertem kultiviertem humanem Knorpelgewebe die Zugabe von WY 14,643 (100 μ M) in die Kultur zu einer signifikant verminderten NO- und PGE₂-Produktion führte (Clockaerts et al. 2011). Bei der Behandlung von LPS-stimulierten murinen VSMC (*vascular smooth muscle cells*) mit Fenofibrat (25, 50 und 100 μ M) zeigte sich konzentrationsabhängig eine reduzierte IL-18-Produktion, eine gesteigerte PPAR α -mRNA-Expression und reduzierte TLR (*toll like receptor*)-4- und TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinase*)-1-mRNA-Expression (Ji et al. 2010). Hingegen konnte in mit IL-1 β stimulierten humanen glatten Muskelzellen der Atemwege kein nachweisbarer Effekt auf die Produktion von G-CSF (*Granulocyte colony stimulating factor*) und GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony stimulating factor*) durch die Zugabe von WY 14,643 (100 μ M) nachgewiesen werden (Patel et al. 2003).

Bezüglich der PPAR α -Expression ist festzuhalten, dass in der Literatur eine Expression des PPAR α vor allem in braunem Fettgewebe, Leber, Herz, Darmmukosa und proximalem Nierentubulus, aber auch in der Retina, Nebenniere, Skelettmuskel und den Inselzellen des Pankreas bei Ratten beschrieben ist (Braissant et al. 1996, Lemberger et al. 1996). In der

Diskussion

Maus wurde PPAR α zudem in intestinalen Epithelien nachgewiesen (Mansén et al. 1996). Außerdem fanden Marx et al. eine ausgeprägte PPAR α Expression in humanen Endothelzellen (Marx et al. 1999). Über die Expression von PPAR α in der Lunge gibt es bisher nur wenige Daten. Patel et al. konnten eine Expression in humanen glatten Muskelzellen der Atemwege zeigen (Patel et al. 2003). In primären humanen Bronchialepithelien sowie in den humanen Lungenepithelzelllinien BEAS 2B, A549 und H292 konnte zwar PPAR γ und β , aber kein PPAR α nachgewiesen werden (Pawliczak et al. 2002). Im Lungenhomogenisat von Mäusen konnten Becker et al. die Expression von PPAR α -mRNA belegen, welche sich durch Fibrat- und Dexamethason-Behandlung steigern bzw. durch LPS-Stimulation verringern ließ (Becker et al. 2008).

Nachdem eine Wirkung des WY 14,643 in AEC II bei *in vitro*-Applikation ausgeblieben war, führten wir per RT-PCR den Nachweis der Expression des PPAR α -Gens sowohl in Gesamtlungenhomogenisat als auch in isolierten AEC II durch (siehe Abb. 21). Dabei fand sich eine hohe Expression von PPAR α im Homogenisat, wohingegen die Expression in den AEC II sehr niedrig war und auch durch LPS-Stimulation nicht gesteigert werden konnte. Somit könnte die geringe PPAR α -Expression in AEC II ursächlich für die ausbleibende Wirkung von *in vitro* appliziertem WY 14,643 sein.

Für die *in vivo*-Applikation wurde eine WY 14,643-Dosis von 1 mg/d gewählt. Diese Dosierung hatte sich in unseren Vorversuchen als wirksam erwiesen und im Mausmodell des akuten Lungenversagens eine deutliche anti-inflammatorische Wirkung erzielt (Schaefer et al. 2008). Von anderen Gruppen war eine wesentlich höhere Dosierung des Fibrats gewählt worden: Delayre-Orthez et al. zeigten in einer Dosisreihe einen maximalen Effekt auf die pulmonale Zellinfiltration bei LPS-stimulierten Mäusen bei einer Vorfütterung mit 15 mg/d (Delayre-Orthez et al. 2005), Becker et al. erreichten eine nachweisbare Reduktion der Methacholin-induzierten Atemwegsobstruktion bei einer Dosierung von 3 und 15 mg/d (Becker et al. 2012).

Hinsichtlich der Effekte der Fibrat-Fütterung lassen sich bei der vorliegenden Arbeit folgende Resultate festhalten:

Durch die *in vivo*-Aktivierung des PPAR α durch WY 14,643 kam es zu einer signifikanten Reduktion der Expression von TNF- α , MIP-2 und TxB₂ in LPS-stimulierten AEC II. Interessanterweise ließ sich sowohl bei TNF- α als auch MIP-2 eine nochmalige Verringerung der Produktion bei zusätzlicher *in vitro*-Applikation vom Fibrat erreichen.

Diskussion

Bei den AEC II aus PPAR α -KO-Mäusen zeigte sich hingegen keinerlei Effekt durch eine Fibratbehandlung. Dies belegt, dass die Wirkung des WY 14,643 auf die Produktion der o.g. Mediatoren über den PPAR α vermittelt sein muss.

Es zeigte sich, dass die *in vivo*-Applikation von WY 14,643 keinen eindeutigen Effekt auf die COX-2-Expression in AEC II hat. In ersten Versuchen hatte sich zunächst zwar eine Reduktion der LPS-induzierten COX-2-Expression im Western Blot bei vorangegangener *in vivo*-Fibratbehandlung angedeutet, jedoch konnte dieser Effekt nicht konstant reproduziert und die Wirkung nicht als statistisch signifikant nachgewiesen werden.

Ähnliche Resultate zeigten sich bei der Messung von PGE₂, einem COX-2-Produkt, im Überstand der Zellkultur. Auch hier war keine signifikante Beeinflussung durch PPAR α -Aktivierung nachweisbar.

Andere Gruppen hatten unterschiedliche Effekte von Fibraten auf die COX-2-Expression beschrieben: Ikawa et al. hatten in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 zunächst die Expression des PPAR α nachgewiesen. Bei Stimulation der Zellen mit TNF- α konnte eine gesteigerte Expression der COX-2 beobachtet werden. Durch Zugabe von WY 14,643 (200 μ m) wurde dieser Effekt nochmals verstärkt (Ikawa et al. 2001). Die Autoren verwiesen auf die Untersuchungen von Meade et al., die in 184B5 Zellen (= humanen Mammaepithelzellen) ebenfalls eine Hochregulation der COX-2-Expression durch PPAR α -Aktivierung nachweisen konnten und dies auf das Vorhandensein eines PPREs (*peroxisome proliferator responsive element*) in der Promoterregion des COX-2-Gens zurückführen (Meade et al. 1999).

Andererseits konnten Staels et al. 1998 belegen, dass die Aktivierung des PPAR α in stimulierten glatten aortalen Muskelzellen zu einer Verminderung der Produktion von IL-6 und Prostaglandin sowie zu einer geringeren Expression der COX-2 führt (Staels 1998). Grau et al. zeigten ebenfalls, dass die *in vitro*-Zugabe von WY 14,643 in einer Konzentration von 50 μ M in aktivierten humanen Kolonkarzinomzellen über den AP-1-Signalweg inhibitorisch auf COX-2 und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) wirkt (Grau et al. 2006).

Anders gelagert sind die Resultate der TxB₂-Konzentration im Überstand von AEC II nach LPS-Stimulation: hier war bei Vorfütterung der WT-Mäuse mit Fibrat eine deutlich reduzierte TxB₂-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Tieren nachweisbar. Zu überlegen ist nun, wie sich die Ergebnisse der TxB₂-Messung in Einklang mit den Resultaten der COX-2- und PGE₂-Bestimmung bringen lassen. Sowohl PGE₂ als auch TxB werden ja aus einem Produkt der COX-2, dem PGH₂, synthetisiert. Möglicherweise beginnt an dieser Stelle die unterschiedliche Regulationsfähigkeit: während PGE₂ über die PGE-Synthasen hergestellt

wird, ist das $\text{Tx}B_2$ ein Produkt der Thromboxansynthase. Deren individuelle Beeinflussung durch $\text{PPAR}\alpha$ -Aktivierung wäre ein noch gezielter zu untersuchender Aspekt.

Interessant ist die Beobachtung, dass sich zwar durch *in vivo*-Applikation von WY 14,643 eine $\text{PPAR}\alpha$ -Aktivierung erzielen liess, nicht aber bei *in vitro*-Gabe in die isolierte AEC II-Zellkultur. Wie oben erwähnt, haben verschiedene andere Gruppen eine Aktivierung bei *in vitro*-Gabe nachweisen können. Dennoch scheint der untersuchte Zelltyp eine wesentliche Rolle zu spielen – für die AEC II lässt sich konstatieren, dass ein intakter Organismus (d.h. *in vivo*) für eine adäquate anti-entzündliche Wirkung des WY 14,643 erforderlich zu sein scheint. Das generelle Phänomen der fehlenden Übertragbarkeit von *in vivo*-Effekten auf *in vitro*-Versuche ist bereits in anderen Bereichen mehrfach beschrieben worden, ursächlich können erforderliche Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen oder das Funktionieren von nur in lebenden Organismen aktiven Signalkaskaden sein (Menke et al. 2011, Akins et al. 1995).

Eine potentielle Limitierung des Versuchsaufbaus liegt in der *in-vivo*-Verabreichung des Fibrats: Möglicherweise ist die Menge des von den Mäusen in der Phase der Vorfütterung täglich aufgenommenen WY 14,643 nicht immer konstant. Aus tierschutzrechtlichen Überlegungen wurden die Tiere stets in Gruppen von mindestens zwei bis maximal vier Tieren pro Käfig gehalten und das Futter mit dem beigemischtem Fibrat für alle Tiere frei zugänglich in der Mitte des Käfigs platziert. Dabei ist natürlich nicht einwandfrei zu kontrollieren, welchen Anteil an der Gesamtfuttermenge die einzelne Maus täglich zu sich nimmt. Dies könnte sich, bei geringer aufgenommener Futtermenge, nachteilig auf die Wirksamkeit des Fibrats auswirken. Zur genaueren Überprüfung müssten die Tiere einzeln gehalten werden, was sich evtl. vorteilhaft auf die Konstanz der Ergebnisse auswirken würde. Naturgemäss ist bei Tierversuchen die Streuung der Ergebnisse durch die individuelle Konstitution der Tiere relativ hoch und die Reproduzierbarkeit von Resultaten oft nur eingeschränkt möglich.

4.5 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmals die Wirkung eines $\text{PPAR}\alpha$ -Aktivators in isolierten primären Lungenepithelzellen untersucht. Es zeigte sich, dass der Applikationsweg des

Diskussion

Fibrats einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit hatte: während sich bei *in vitro*-Applikation kein nachweisbarer Effekt auf den Ablauf einer Entzündungsreaktion in den AEC II zeigte, war bei *in vivo*-Gabe ein anti-inflammatorischer Effekt auf die Produktion von Thromboxan und Zytokinen festzustellen.

Sicher ist, dass die AEC II in der Pathophysiologie der entzündlichen Lungenerkrankungen im Allgemeinen und beim ALI/ARDS im Besonderen eine ganz entscheidende Rolle spielen. Umso wichtiger ist daher die Untersuchung weiterer potentiell einsetzbarer therapeutischer Substanzen, welche direkten Einfluss auf das Verhalten der AEC II nehmen könnten.

Der mögliche Einsatz von PPAR α -aktivierenden Substanzen, wie z.B. Fibraten, scheint vielversprechend und bedarf sicher weiterer intensivierter Forschung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das akute Lungenversagen (ALI (*acute lung injury*)/ARDS (*acute respiratory distress syndrome*)) gehört zu den schwerwiegendsten Komplikationen bei der Behandlung von Intensivpatienten und ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität vergesellschaftet. Trotz vieler Fortschritte hinsichtlich des Verständnisses der Pathogenese existieren bislang nur wenige, Evidenz-basierte Therapiekonzepte. Gezielte pharmakologische Therapieansätze zeigten sich bei einer grossen Anzahl von Studien bisher enttäuschend.

Da die pulmonalen Alveolarepithelzellen (AEC) Typ II durch Surfactant-Produktion und Gewährleistung der epithelialen Barriere der Alveole eine entscheidene Rolle in der Pathophysiologie des ALI/ARDS spielen, sind pharmakologische Ansätze zur Vermeidung oder Reduktion der hier entstehenden alveolären Schädigung von grosser Relevanz.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer Aktivierung des anti-inflammatorisch wirksamen PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) α in isolierten murinen AEC II nach Auslösen einer akuten Entzündungsreaktion durch Lipopolysaccharid (LPS) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *in vivo*-Aktivierung von PPAR α durch das Fenofibrat WY 14,643 zu einer signifikanten Reduktion der Expression pro-inflammatorischer Mediatoren, wie TNF- α , MIP-2 und TxB₂, führt. Die ebenfalls pro-inflammatorisch wirksame Cyclooxygenase (COX)-2 und ihr Produkt, Prostaglandin (PG) E₂, blieben dagegen unbeeinflusst von der PPAR α -Aktivierung.

Interessanterweise zeigte sich bei *in vitro*-Applikation des Fibrats kein nachweisbarer Effekt auf die Entzündungsreaktion der AEC II, was möglicherweise auf einer geringe Expression des PPAR α in AEC II zurückzuführen ist.

Insgesamt zeigen Fibrate auch in in der Lunge eine potente anti-entzündliche Wirkung und sollten als möglicher pharmakologisch-therapeutischer Ansatz in der Behandlung entzündlicher Lungenerkrankungen und besonders im ALI/ARDS weiter erforscht werden.

5. SUMMARY

Acute lung injury (ALI/ARDS (acute respiratory distress syndrome)) is one of the most severe complications in the treatment of patients in intensive care units and is associated with high morbidity and mortality. In spite of broad improvement in the comprehension of the pathogenesis, only few evidence-based therapy concepts do yet exist. Several studies investigating specific therapeutical approaches remained disappointing thus far.

As pulmonary alveolar epithelial cells (AEC) type II play a decent role in the pathophysiology of ALI/ARDS by producing surfactant and providing the epithelial barrier of the alveolus, pharmacological approaches to prevent or reduce the local alveolar damage are of great relevance.

In this study we investigated the effect of activation of PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) α , known for its antiinflammatory potential, in isolated and LPS (lipopolysaccharid)-stimulated AEC II. It could be seen, that *in vivo*-activation of PPAR α by the fenofibrate WY 14,643 leads to a significant reduction in expression of proinflammatory mediators like TNF- α , MIP-2 and Tx B_2 . Expression of the likewise proinflammatory cyclooxygenase (COX)-2 and its product prostaglandin (PG) E $_2$ remained thereby unaffected by PPAR α -activation.

Interestingly there was no effect on the inflammatory reaction in AEC II by *in vitro*-activation of PPAR α , possibly due to low expression of PPAR α in AEC II.

Taken together fibrates show a potent antiinflammatory effect also in the lung and should be further investigated as a possible pharmacological therapeutic approach in the treatment of inflammatory lung diseases, in particular in ALI/ARDS.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham, E.; Baughman, R.; Fletcher, E.; Heard, S.; Lamberti, J.; Levy, H. et al. (1999): Liposomal prostaglandin E1 (TLC C-53) in acute respiratory distress syndrome: a controlled, randomized, double-blind, multicenter clinical trial. TLC C-53 ARDS Study Group. In: *Crit Care Med* 27 (8), S. 1478–1485.
- Adamson, I. Y.; Hedgecock, C.; Bowden, D. H. (1990): Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair. In: *Am. J. Pathol.* 137 (2), S. 385–392.
- Adhikari, Neill K. J.; Burns, Karen E. A.; Friedrich, Jan O.; Granton, John T.; Cook, Deborah J.; Meade, Maureen O. (2007): Effect of nitric oxide on oxygenation and mortality in acute lung injury: systematic review and meta-analysis. In: *BMJ* 334 (7597), S. 779.
- Aggarwal, Bharat B. (2003): Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. In: *Nat. Rev. Immunol.* 3 (9), S. 745–756.
- Akins, D. R.; Porcella, S. F.; Popova, T. G.; Shevchenko, D.; Baker, S. I.; Li, M. et al. (1995): Evidence for in vivo but not in vitro expression of a *Borrelia burgdorferi* outer surface protein F (OspF) homologue. In: *Mol Microbiol* 18 (3), S. 507–520.
- Alberts, Bruce (2002): Molecular biology of the cell. 4. Aufl. New York: Garland Science.
- Anzueto, A.; Baughman, R. P.; Guntupalli, K. K.; Weg, J. G.; Wiedemann, H. P.; Raventós, A. A. et al. (1996): Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. In: *N. Engl. J. Med.* 334 (22), S. 1417–1421.
- Artigas, A.; Bernard, G. R.; Carlet, J.; Dreyfuss, D.; Gattinoni, L.; Hudson, L. et al. (1998): The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2: Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. Acute respiratory distress syndrome. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 157 (4 Pt 1), S. 1332–1347.
- Ashbaugh DG (1967): Acute respiratory distress in adults. In: *Lancet* (Aug 12;2(7511)), S. 319–323.
- Becker, Julien; Delayre-Orthez, Carine; Frossard, Nelly; Pons, Françoise (2008): Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α expression during lung inflammation. In: *Pulm Pharmacol Ther* 21 (2), S. 324–330.
- Becker, Julien; Delayre-Orthez, Carine; Frossard, Nelly; Pons, Françoise (2012): The peroxisome proliferator-activated receptor α agonist fenofibrate decreases airway reactivity to methacholine and increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in mouse lung. In: *Fundam Clin Pharmacol* 26 (3), S. 340–346.
- Beers, Michael F. (1994): Localization, Synthesis, and Processing of Surfactant Protein SP-C in Rat Lung Analyzed by Epitope-specific Antipeptide Antibodies. In: *The Journal of Biological Chemistry* 269 (32), S. 20318–20328.
- Belvisi, Maria G.; Hele, David J. (2008): Peroxisome proliferator-activated receptors as novel targets in lung disease. In: *Chest* 134 (1), S. 152–157.

Literaturverzeichnis

- Bernard, G. R.; Wheeler, A. P.; Arons, M. M.; Morris, P. E.; Paz, H. L.; Russell, J. A.; Wright, P. E. (1997): A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. The Antioxidant in ARDS Study Group. In: *Chest* 112 (1), S. 164–172.
- Bernard GR (1994): The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. In: *Am J Respir Crit Care Med* (149(3 Pt 1)), S. 818–824.
- Braissant, O.; Fougelle, F.; Scotto, C.; Dauca, M.; Wahli, W. (1996): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. In: *Endocrinology* 137 (1), S. 354–366.
- Brun-Buisson, Christian; Minelli, Cosetta; Bertolini, Guido; Brazzi, Luca; Pimentel, Jorge; Lewandowski, Klaus et al. (2004): Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. In: *Intensive Care Med* 30 (1), S. 51–61.
- Chandrasekharan, N. V.; Dai, Hu; Roos, K. Lamar Turepu; Evanson, Nathan K.; Tomsik, Joshua; Elton, Terry S.; Simmons, Daniel L. (2002): COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (21), S. 13926–13931.
- Chen, Aaron C-H; Arany, Praveen R.; Huang, Ying-Ying; Tomkinson, Elizabeth M.; Sharma, Sulbha K.; Kharkwal, Gitika B. et al. (2011): Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. In: *PLoS One* 6 (7), S. e22453.
- Clockaerts, S.; Bastiaansen-Jenniskens, Y. M.; Feijt, C.; Verhaar, J. A. N.; Somville, J.; Clerck, L. S. de; van Osch, G. J. V. M. (2011): Peroxisome proliferator activated receptor alpha activation decreases inflammatory and destructive responses in osteoarthritic cartilage. In: *Osteoarthritis Cartilage* 19 (7), S. 895–902.
- Cooper, Geoffrey M. (op. 2000): *The Cell. A molecular approach*. 2. Aufl. Washington, D.C, Sunderland (Mass.): ASM Press; Sinauer Associates.
- Corti, M.; Brody, A. R.; Harrison, J. H. (1996): Isolation and primary culture of murine alveolar type II cells. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 14 (4), S. 309–315.
- Cox, A.; Duff, G. W. (1996): Cytokines as genetic modifying factors in immune and inflammatory diseases. In: *J Pediatr Endocrinol Metab* 9 Suppl 1, S. 129–132.
- Crofford, L. J. (1997): COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. In: *J Rheumatol Suppl* 49, S. 15–19.
- Cunard, Robyn; Ricote, Mercedes; DiCampli, Dennis; Archer, D. Clay; Kahn, Daniel A.; Glass, Christopher K.; Kelly, Carolyn J. (2002): Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. In: *J Immunol* 168 (6), S. 2795–2802.
- Cuzzocrea, Salvatore; Mazzon, Emanuela; Di Paola, Rosanna; Peli, Angelo; Bonato, Andrea; Britti, Domenico et al. (2006): The role of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) in the regulation of acute inflammation. In: *J Leukoc Biol* 79 (5), S. 999–1010.
- Darnay, B. G.; Aggarwal, B. B. (1997): Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. In: *J. Leukoc. Biol.* 61 (5), S. 559–566.

Literaturverzeichnis

- Davatelis, G.; Wolpe, S. D.; Sherry, B.; Dayer, J. M.; Chicheportiche, R.; Cerami, A. (1989): Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. In: *Science* 243 (4894 Pt 1), S. 1066–1068.
- Delayre-Orthez, Carine; Becker, Julien; Auwerx, Johan; Frossard, Nelly; Pons, Françoise (2008): Suppression of allergen-induced airway inflammation and immune response by the peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist fenofibrate. In: *Eur J Pharmacol* 581 (1-2), S. 177–184.
- Delayre-Orthez, Carine; Becker, Julien; Guenon, Isabelle; Lagente, Vincent; Auwerx, Johan; Frossard, Nelly; Pons, Françoise (2005): PPAR α downregulates airway inflammation induced by lipopolysaccharide in the mouse. In: *Respir Res* 6, S. 91.
- Delerive, P.; Bosscher, K. de; Besnard, S.; Vanden Berghe, W.; Peters, J. M.; Gonzalez, F. J. et al. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. In: *J Biol Chem* 274 (45), S. 32048–32054.
- Delerive, P.; Gervois, P.; Fruchart, J. C.; Staels, B. (2000): Induction of IkappaB α expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor- α activators. In: *J. Biol. Chem.* 275 (47), S. 36703–36707.
- Dellinger, R. P.; Zimmerman, J. L.; Taylor, R. W.; Straube, R. C. (1998): Placebo and inhaled nitric oxide mortality the same in ARDS clinical trial. In: *Crit Care Med* 26 (3), S. 619.
- Desvergne B, Wahli W. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. In: *Endocr Rev* (20(5)), S. 649–688.
- Devchand, P. R.; Keller, H.; Peters, J. M.; Vazquez, M.; Gonzalez, F. J.; Wahli, W. (1996): The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. In: *Nature* 384 (6604), S. 39–43.
- Diaz-Munoz, Manuel D.; Osma-Garcia, Ines C.; Cacheiro-Llaguno, Cristina; Fresno, Manuel; Iniguez, Miguel A. (2010): Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages. In: *Cell Signal* 22 (10), S. 1427–1436.
- Diep, Quy N.; Amiri, Farhad; Touyz, Rhian M.; Cohn, Jeffrey S.; Endemann, Dierk; Neves, Mario Fritsch; Schiffrin, Ernesto L. (2002): PPAR α activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. In: *Hypertension* 40 (6), S. 866–871.
- Diglio, C. A.; Kikkawa, Y. (1977): The type II epithelial cells of the lung. IV. Adaption and behavior of isolated type II cells in culture. In: *Lab. Invest.* 37 (6), S. 622–631.
- Dobbs, L. G. (1990): Isolation and culture of alveolar type II cells. In: *Am J Physiol* 258 (4 Pt 1), S. L134–47.
- Driscoll, K. E. (1994): Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. In: *Exp Lung Res* 20 (6), S. 473–490.
- Dubois, R. N.; Abramson, S. B.; Crofford, L.; Gupta, R. A.; Simon, L. S.; van de Putte, L. B.; Lipsky, P. E. (1998): Cyclooxygenase in biology and disease. In: *FASEB J* 12 (12), S. 1063–1073.
- Escher, P.; Braissant, O.; Basu-Modak, S.; Michalik, L.; Wahli, W.; Desvergne, B. (2001): Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. In: *Endocrinology* 142 (10), S. 4195–4202.

Literaturverzeichnis

- Evans, M. J.; Cabral, L. J.; Stephens, R. J.; Freeman, G. (1973): Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. In: *Am. J. Pathol.* 70 (2), S. 175–198.
- Evans, R. M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. In: *Science* 240 (4854), S. 889–895.
- Fang, Xiaohui; Neyrinck, Arne P.; Matthay, Michael A.; Lee, Jae W. (2010): Allogeneic human mesenchymal stem cells restore epithelial protein permeability in cultured human alveolar type II cells by secretion of angiopoietin-1. In: *J Biol Chem* 285 (34), S. 26211–26222.
- Fehrenbach, Heinz (2001): Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. In: *Respiratory Research* (2), S. 33–46.
- Ferré, Pascal (2004): The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. In: *Diabetes* 53 Suppl 1, S. S43-50.
- Fuchs, Sabine; Hollins, Andrew John; Laue, Michael; Schaefer, Ulrich Friedrich; Roemer, Klaus; Gumbleton, Mark; Lehr, Claus-Michael (2003): Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C. In: *Cell Tissue Res* 311 (1), S. 31–45.
- Funk, C. D. (2001): Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. In: *Science* 294 (5548), S. 1871–1875.
- Funk, Colin D.; FitzGerald, Garret A. (2007): COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 50 (5), S. 470–479.
- Genovese, Tiziana; Mazzon, Emanuela; Di Paola, Rosanna; Muià, Carmelo; Crisafulli, Concetta; Caputi, Achille P.; Cuzzocrea, Salvatore (2005): Role of endogenous and exogenous Ligands for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha in the Development of Bleomycin-Induced Lung Injury. In: *Shock* 24 (6), S. 547–555.
- Ghashghaieinia, Mehrdad; Toulany, Mahmoud; Saki, Mohammad; Bobbala, Diwakar; Fehrenbacher, Birgit; Rupec, Rudolf et al. (2011): The NFκB Pathway Inhibitors Bay 11-7082 and Parthenolide Induce Programmed Cell Death in Anucleated Erythrocytes. In: *Cell Physiol Biochem* 27 (1), S. 45–54.
- Gotts, Jeffrey E.; Matthay, Michael A. (2011): Mesenchymal stem cells and acute lung injury. In: *Crit Care Clin* 27 (3), S. 719–733.
- Grau, Raquel; Punzon, Carmen; Fresno, Manuel; Iniguez, Miguel A. (2006): Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1. In: *Biochem J* 395 (1), S. 81–88.
- Hecker, Matthias; Walmrath, Hans-Dieter; Seeger, Werner; Mayer, Konstantin (2008): Clinical Aspects of Acute Lung Insufficiency (ALI/TRALI). In: *Transfus Med Hemother* (35), S. 80–88.
- Herold, Susanne (2006): Alveolar Epithelial Cells Direct Monocyte Transepithelial Migration upon Influenza Virus Infection: Impact of Chemokines and Adhesion Molecules. In: *The Journal of Immunology* (177), S. 1817–1824.
- Hinz, Burkhard; Brune, Kay (2002): Cyclooxygenase-2--10 years later. In: *J Pharmacol Exp Ther* 300 (2), S. 367–375.

Literaturverzeichnis

- Hourton, D.; Delerive, P.; Stankova, J.; Staels, B.; Chapman, M. J.; Ninio, E. (2001): Oxidized low-density lipoprotein and peroxisome-proliferator-activated receptor alpha down-regulate platelet-activating-factor receptor expression in human macrophages. In: *Biochem J* 354 (Pt 1), S. 225–232.
- Huang, S.; Paulauskis, J. D.; Godleski, J. J.; Kobzik, L. (1992): Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. In: *Am J Pathol* 141 (4), S. 981–988.
- Ikawa, H.; Kameda, H.; Kamitani, H.; Baek, S. J.; Nixon, J. B.; Hsi, L. C.; Eling, T. E. (2001): Effect of PPAR activators on cytokine-stimulated cyclooxygenase-2 expression in human colorectal carcinoma cells. In: *Exp. Cell Res.* 267 (1), S. 73–80.
- Issemann, I.; Green, S. (1990): Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. In: *Nature* 347 (6294), S. 645–650.
- Ji, Yuanyuan; Wang, Zhidong; Li, Zongfang; Liu, Juntian (2010): Modulation of LPS-mediated inflammation by fenofibrate via the TRIF-dependent TLR4 signaling pathway in vascular smooth muscle cells. In: *Cell Physiol Biochem* 25 (6), S. 631–640.
- Kalina, M.; Mason, R. J.; Shannon, J. M. (1992): Surfactant protein C is expressed in alveolar type II cells but not in Clara cells of rat lung. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6 (6), S. 594–600.
- Kang, B. H.; Crapo, J. D.; Wegner, C. D.; Letts, L. G.; Chang, L. Y. (1993): Intercellular adhesion molecule-1 expression on the alveolar epithelium and its modification by hyperoxia. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9 (4), S. 350–355.
- Keech, A. C.; Mitchell, P.; Summanen, P. A.; O'Day, J.; Davis, T. M. E.; Moffitt, M. S. et al. (2007): Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. In: *Lancet* 370 (9600), S. 1687–1697.
- Kersten, S.; Wahli, W. (2000): Peroxisome proliferator activated receptor agonists. In: *EXS* 89, S. 141–151.
- Kesecioglu, Jozef; Haitsma, Jack J. (2006): Surfactant therapy in adults with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. In: *Curr Opin Crit Care* 12 (1), S. 55–60.
- Kleemann, Robert; Bureeva, Svetlana; Perlina, Ally; Kaput, Jim; Verschuren, Lars; Wielinga, Peter Y. et al. (2011): A Systems Biology Strategy for Predicting Similarities and Differences of Drug Effects: Evidence for Drug-specific Modulation of Inflammation in Atherosclerosis. In: *BMC Syst Biol* 5 (1), S. 125.
- Kliwer, S. A.; Sundseth, S. S.; Jones, S. A.; Brown, P. J.; Wisely, G. B.; Koble, C. S. et al. (1997): Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (9), S. 4318–4323.
- Kujubu, D. A.; Fletcher, B. S.; Varnum, B. C.; Lim, R. W.; Herschman, H. R. (1991): TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. In: *J Biol Chem* 266 (20), S. 12866–12872.
- Lee, Jimmy W.; Bajwa, Poonam J.; Carson, Monica J.; Jeske, Daniel R.; Cong, Yingzi; Elson, Charles O. et al. (2007): Fenofibrate represses interleukin-17 and interferon-gamma expression and improves colitis in interleukin-10-deficient mice. In: *Gastroenterology* 133 (1), S. 108–123.

Literaturverzeichnis

- Lee, S. S.; Pineau, T.; Drago, J.; Lee, E. J.; Owens, J. W.; Kroetz, D. L. et al. (1995): Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. In: *Mol. Cell. Biol.* 15 (6), S. 3012–3022.
- Legler, Daniel F.; Bruckner, Markus; Uetz-von Allmen, Edith; Krause, Petra (2010): Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (2), S. 198–201.
- Lemberger, T.; Braissant, O.; Juge-Aubry, C.; Keller, H.; Saladin, R.; Staels, B. et al. (1996): PPAR tissue distribution and interactions with other hormone-signaling pathways. In: *Ann N Y Acad Sci* 804, S. 231–251.
- Lewis, J. F.; Jobe, A. H. (1993): Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 147 (1), S. 218–233.
- Liu, Kathleen D.; Levitt, Joseph; Zhuo, Hanjing; Kallet, Richard H.; Brady, Sandra; Steingrub, Jay et al. (2008): Randomized Clinical Trial of Activated Protein C for the Treatment of Acute Lung Injury. In: *Am J Respir Crit Care Med* 178 (6), S. 618–623.
- Long, W.; Corbet, A.; Cotton, R.; Courtney, S.; McGuinness, G.; Walter, D. et al. (1991): A controlled trial of synthetic surfactant in infants weighing 1250 g or more with respiratory distress syndrome. The American Exosurf Neonatal Study Group I, and the Canadian Exosurf Neonatal Study Group. In: *N Engl J Med* 325 (24), S. 1696–1703.
- Lunn, J. J.; Murray, M. J. (1998): Acute respiratory distress syndrome. In: *Yale J Biol Med* 71 (6), S. 457–467.
- Macklin, C. C. (1954): The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumonocytes. In: *Lancet* 266 (6822), S. 1099–1104.
- Mansén, A.; Guardiola-Diaz, H.; Rafter, J.; Branting, C.; Gustafsson, J. A. (1996): Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222 (3), S. 844–851.
- Marx, N.; Sukhova, G. K.; Collins, T.; Libby, P.; Plutzky, J. (1999): PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. In: *Circulation* 99 (24), S. 3125–3131.
- Masferrer, J. L.; Reddy, S. T.; Zweifel, B. S.; Seibert, K.; Needleman, P.; Gilbert, R. S.; Herschman, H. R. (1994): In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. In: *J Pharmacol Exp Ther* 270 (3), S. 1340–1344.
- Mason, R. J.; Williams, M. C.; Widdicombe, J. H.; Sanders, M. J.; Misfeldt, D. S.; Berry, L. C. (1982): Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (19), S. 6033–6037.
- Matthay, M. A.; Folkesson, H. G.; Verkman, A. S. (1996): Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. In: *Am. J. Physiol.* 270 (4 Pt 1), S. L487–503.
- Matthay, Michael A. (2003): Acute respiratory distress syndrome. New York: M. Dekker (Lung biology in health and disease, 179).
- Matthay, Michael A.; Brower, Roy G.; Carson, Shannon; Douglas, Ivor S.; Eisner, Mark; Hite, Duncan et al. (2011): Randomized, placebo-controlled clinical trial of an aerosolized

Literaturverzeichnis

- beta(2)-agonist for treatment of acute lung injury. In: *Am J Respir Crit Care Med* 184 (5), S. 561–568.
- Matthay, Michael A.; Thompson, B. Taylor; Read, Elizabeth J.; McKenna, David H., JR; Liu, Kathleen D.; Calfee, Carolyn S.; Lee, Jae Woo (2010): Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for severe acute lung injury. In: *Chest* 138 (4), S. 965–972.
- Mayer, Konstantin; Gokorsch, Stephanie; Fegbeutel, Christine; Hattar, Katja; Rosseau, Simone; Walmrath, Dieter et al. (2003): Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167 (10), S. 1321–1328.
- Meade, E. A.; McIntyre, T. M.; Zimmerman, G. A.; Prescott, S. M. (1999): Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. In: *J Biol Chem* 274 (12), S. 8328–8334.
- Menke, Christina; Goncharov, Tatiana; Qamar, Lubna; Korch, Christopher; Ford, Heide L.; Behbakht, Kian et al. (2011): TRAIL Receptor Signaling Regulation of Chemosensitivity In Vivo but Not In Vitro. In: *PLoS ONE* 6 (1), S. e14527.
- Mishra, Archana; Chaudhary, Ashok; Sethi, Sanjeev (2004): Oxidized omega-3 fatty acids inhibit NF-kappaB activation via a PPARalpha-dependent pathway. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (9), S. 1621–1627.
- Mitchell, J. A.; Warner, T. D. (1999): Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. In: *Br J Pharmacol* 128 (6), S. 1121–1132.
- Mukaida, N.; Ishikawa, Y.; Ikeda, N.; Fujioka, N.; Watanabe, S.; Kuno, K.; Matsushima, K. (1996): Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappaB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin in vivo. In: *J. Leukoc. Biol.* 59 (2), S. 145–151.
- Müller, Thomas; Bein, Thomas; Philipp, Alois; Graf, Bernhard; Schmid, Christof; Riegger, Günter (2013): Extracorporeal pulmonary support in severe pulmonary failure in adults: a treatment rediscovered. In: *Dtsch Arztebl Int* 110 (10), S. 159–166.
- O'Dea, Kieran P.; Young, Arnold J.; Yamamoto, Hirotohi; Robotham, James L.; Brennan, Fionula M.; Takata, Masao (2005): Lung-marginated monocytes modulate pulmonary microvascular injury during early endotoxemia. In: *Am J Respir Crit Care Med* 172 (9), S. 1119–1127.
- Patel, Hema J.; Belvisi, Maria G.; Bishop-Bailey, David; Yacoub, Magdi H.; Mitchell, Jane A. (2003): Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy. In: *J Immunol* 170 (5), S. 2663–2669.
- Paukkeri, E-L; Leppänen, T.; Sareila, O.; Vuolteenaho, K.; Kankaanranta, H.; Moilanen, E. (2007): PPARalpha agonists inhibit nitric oxide production by enhancing iNOS degradation in LPS-treated macrophages. In: *Br. J. Pharmacol.* 152 (7), S. 1081–1091.
- Pawliczak, Rafal; Han, Chang; Huang, Xiu-Li; Demetris, A. Jake; Shelhamer, James H.; Wu, Tong (2002): 85-kDa cytosolic phospholipase A2 mediates peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in human lung epithelial cells. In: *J Biol Chem* 277 (36), S. 33153–33163.
- Peek, Giles J.; Mugford, Miranda; Tiruvoipati, Ravindranath; Wilson, Andrew; Allen, Elizabeth; Thalanany, Mariamma M. et al. (2009): Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe

Literaturverzeichnis

- adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomised controlled trial. In: *Lancet* 374 (9698), S. 1351–1363.
- Petty, T. L.; Ashbaugh, D. G. (1971): The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. In: *Chest* 60 (3), S. 233–239.
- Pfeifer, M. (2010): Akute respiratorische Insuffizienz bei schwerer Lungenschädigung - ARDS und ALI. In: *Pneumologie* 64 (9), S. 590–594.
- Phizackerley, P. J.; Town, M. H.; Newman, G. E. (1979): Hydrophobic proteins of lamellated osmiophilic bodies isolated from pig lung. In: *Biochem. J.* 183 (3), S. 731–736.
- Pison, U.; Max, M.; Neuendank, A.; Weissbach, S.; Pietschmann, S. (1994): Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system. In: *Eur. J. Clin. Invest.* 24 (9), S. 586–599.
- Pomini, F.; Caruso, A.; Challis, J. R. (1999): Interleukin-10 modifies the effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on the activity and expression of prostaglandin H synthase-2 and the NAD⁺-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in cultured term human villous trophoblast and chorion trophoblast cells. In: *J Clin Endocrinol Metab* 84 (12), S. 4645–4651.
- Rahman, Masmudur M.; McFadden, Grant (2006): Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. In: *PLoS Pathog* 2 (2), S. e4.
- Reynders, Veerle; Loitsch, Stefan; Steinhauer, Constanze; Wagner, Thomas; Steinhilber, Dieter; Bargon, Joachim (2006): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) down-regulation in cystic fibrosis lymphocytes. In: *Respir. Res.* 7, S. 104.
- Ricciotti, E.; FitzGerald, G. A. (2011): Prostaglandins and Inflammation. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (5), S. 986–1000.
- Richman, P. S.; Spragg, R. G.; Robertson, B.; Merritt, T. A.; Curstedt, T. (1989): The adult respiratory distress syndrome: first trials with surfactant replacement. In: *Eur Respir J Suppl* 3, S. 109s-111s.
- Rosseau, S.; Selhorst, J.; Wiechmann, K.; Leissner, K.; Maus, U.; Mayer, K. et al. (2000): Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. In: *J. Immunol.* 164 (1), S. 427–435.
- Rubinfeld, Gordon D.; Caldwell, Ellen; Peabody, Eve; Weaver, Jim; Martin, Diane P.; Neff, Margaret et al. (2005): Incidence and outcomes of acute lung injury. In: *N. Engl. J. Med.* 353 (16), S. 1685–1693.
- Samuelsson, Bengt; Morgenstern, Ralf; Jakobsson, Per-Johan (2007): Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. In: *Pharmacol. Rev.* 59 (3), S. 207–224.
- Schaefer, M. B.; Pose, A.; Ott, J.; Hecker, M.; Behnk, A.; Schulz, R. et al. (2008): Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reduces inflammation and vascular leakage in a murine model of acute lung injury. In: *Eur. Respir. J* 32 (5), S. 1344–1353.
- Schumann, R. R. (1992): Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. In: *Res. Immunol.* 143 (1), S. 11–15.

Literaturverzeichnis

- Seeger, W.; Günther, A.; Walmrath, H. D.; Grimminger, F.; Lasch, H. G. (1993): Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome. Pathogenetic role and therapeutic prospects. In: *Clin Investig* 71 (3), S. 177–190.
- Seeger, W.; Lasch, H. G. (1987): Septic lung. In: *Rev. Infect. Dis.* 9 Suppl 5, S. S570-9.
- Senftleben, U.; Cao, Y.; Xiao, G.; Greten, F. R.; Krahn, G.; Bonizzi, G. et al. (2001): Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. In: *Science* 293 (5534), S. 1495–1499.
- Shirinsky, Ivan; Polovnikova, Oksana; Kalinovskaya, Natalia; Shirinsky, Valery (2012): The effects of fenofibrate on inflammation and cardiovascular markers in patients with active rheumatoid arthritis: a pilot study. In: *Rheumatol. Int.*
- Simpson, S. Q.; Casey, L. C. (1989): Role of tumor necrosis factor in sepsis and acute lung injury. In: *Crit Care Clin* 5 (1), S. 27–47.
- Skerrett, S. J.; Martin, T. R.; Chi, E. Y.; Peschon, J. J.; Mohler, K. M.; Wilson, C. B. (1999): Role of the type 1 TNF receptor in lung inflammation after inhalation of endotoxin or *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Am. J. Physiol.* 276 (5 Pt 1), S. L715-27.
- Smith, W. L.; Garavito, R. M.; DeWitt, D. L. (1996): Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. In: *J Biol Chem* 271 (52), S. 33157–33160.
- Spragg, R. G.; Gilliard, N.; Richman, P.; Smith, R. M.; Hite, R. D.; Pappert, D. et al. (1994): Acute effects of a single dose of porcine surfactant on patients with the adult respiratory distress syndrome. In: *Chest* 105 (1), S. 195–202.
- Spragg, Roger G.; Lewis, James F.; Walmrath, Hans-Dieter; Johannigman, Jay; Bellingan, Geoff; Laterre, Pierre-Francois et al. (2004): Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome. In: *N Engl J Med* 351 (9), S. 884–892.
- Staels, B. (1998): Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. In: *Nature* (No. 6687 (1998)), S. 790–792.
- Steinberg, Kenneth P.; Hudson, Leonard D.; Goodman, Richard B.; Hough, Catherine Lee; Lanken, Paul N.; Hyzy, Robert et al. (2006): Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. In: *N Engl J Med* 354 (16), S. 1671–1684.
- Straus, Daniel S.; Glass, Christopher K. (2007): Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. In: *Trends Immunol* 28 (12), S. 551–558.
- Taberner, Antonia; Schoonjans, Kristina; Jesel, Laurence; Carpusca, Irina; Auwerx, Johan; Andriantsitohaina, Ramarison (2002): Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against myocardial ischaemic injury and improves endothelial vasodilatation. In: *BMC Pharmacol.* 2, S. 10.
- Tak, P. P.; Firestein, G. S. (2001): NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. In: *J. Clin. Invest.* 107 (1), S. 7–11.
- Takeuchi, O.; Hoshino, K.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Takada, H.; Ogawa, T. et al. (1999): Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. In: *Immunity* 11 (4), S. 443–451.
- The ARDS Definition Task Force* (2012): Acute Respiratory Distress SyndromeThe Berlin DefinitionThe Berlin Definition of ARDS. In: *JAMA*, S. 1.

Literaturverzeichnis

- Tong, Min; Ding, Yunfei; Tai, Hsin-Hsiung (2006): Reciprocal regulation of cyclooxygenase-2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in A549 human lung adenocarcinoma cells. In: *Carcinogenesis* 27 (11), S. 2170–2179.
- Uematsu, Satoshi; Matsumoto, Makoto; Takeda, Kiyoshi; Akira, Shizuo (2002): Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. In: *J. Immunol.* 168 (11), S. 5811–5816.
- Uhal, B. D. (1997): Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. In: *Am. J. Physiol.* 272 (6 Pt 1), S. L1031-45.
- Ulevitch, R. J.; Tobias, P. S. (1995): Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. In: *Annu. Rev. Immunol* 13, S. 437–457.
- Ulich, T. R.; Yi, E. S.; Longmuir, K.; Yin, S.; Biltz, R.; Morris, C. F. et al. (1994): Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. In: *J. Clin. Invest.* 93 (3), S. 1298–1306.
- Vamecq J, Latruffe N. (1999): Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. In: *Lancet* (354(9173)), S. 141–148.
- Vane, J. R. (1971): Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. In: *Nature New Biol.* 231 (25), S. 232–235.
- Vincent, J. L.; Brase, R.; Santman, F.; Suter, P. M.; McLuckie, A.; Dhainaut, J. F. et al. (2001): A multi-centre, double-blind, placebo-controlled study of liposomal prostaglandin E1 (TLC C-53) in patients with acute respiratory distress syndrome. In: *Intensive Care Med* 27 (10), S. 1578–1583.
- Walmrath, D.; Grimminger, F.; Pappert, D.; Knothe, C.; Obertacke, U.; Benzing, A. et al. (2002): Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock: impact on gas exchange and haemodynamics. In: *Eur Respir J* 19 (5), S. 805–810.
- Walmrath, D.; Gunther, A.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R.; Schneider, T.; Grimminger, F.; Seeger, W. (1996): Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis. In: *Am J Respir Crit Care Med* 154 (1), S. 57–62.
- Walmrath, D.; Schneider, T.; Pilch, J.; Grimminger, F.; Seeger, W. (1993): Aerosolised prostacyclin in adult respiratory distress syndrome. In: *Lancet* 342 (8877), S. 961–962.
- Ward, P. A. (1996): Role of complement, chemokines, and regulatory cytokines in acute lung injury. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 796, S. 104–112.
- Ware, L. B.; Matthay, M. A. (2001): Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. In: *Am J Respir Crit Care Med* 163 (6), S. 1376–1383.
- Ware, Lorraine B.; Matthay, Michael A. (2000): The Acute Respiratory Distress Syndrome. In: *N Engl J Med* 342 (18), S. 1334–1349.
- Wheeler, Arthur P.; Bernard, Gordon R. (2007): Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. In: *Lancet* 369 (9572), S. 1553–1564.
- Willson, Douglas F.; Thomas, Neal J.; Markovitz, Barry P.; Bauman, Loren A.; DiCarlo, Joseph V.; Pon, Steven et al. (2005): Effect of exogenous surfactant (calfactant) in pediatric acute lung injury: a randomized controlled trial. In: *JAMA* 293 (4), S. 470–476.

Literaturverzeichnis

- Wolpe, S. D.; Sherry, B.; Juers, D.; Davatelis, G.; Yurt, R. W.; Cerami, A. (1989): Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (2), S. 612–616.
- Wolpe, S. D.; Davatelis, G.; Sherry, B.; Beutler, B.; Hesse, D. G.; Nguyen, H. T. et al. (1988): Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. In *J Exp Med* 167 (2), pp. 570–581.
- Wright, S. D.; Ramos, R. A.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J.; Mathison, J. C. (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. In: *Science* 249 (4975), S. 1431–1433.
- Wu, K. K. (1995): Molecular regulation and augmentation of prostacyclin biosynthesis. In: *Agents Actions Suppl* 45, S. 11–17.
- Xing, Z.; Jordana, M.; Kirpalani, H.; Driscoll, K. E.; Schall, T. J.; Gauldie, J. (1994): Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 10 (2), S. 148–153.
- Xun, C. Q.; Ensor, C. M.; Tai, H. H. (1991): Regulation of synthesis and activity of NAD(+)-dependent 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) by dexamethasone and phorbol ester in human erythroleukemia (HEL) cells. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177 (3), S. 1258–1265.
- Yan, Xiaojuan; Wu Xiao, Chao; Sun, Meihua; Tsang, Benjamin K.; Gibb, William (2002): Nuclear factor kappa B activation and regulation of cyclooxygenase type-2 expression in human amnion mesenchymal cells by interleukin-1beta. In: *Biol Reprod* 66 (6), S. 1667–1671.

7. ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

15-PGDH	15-Prostaglandindehydrogenase
Abb.	Abbildung
AEC	<i>alveolar epithelial cell</i>
ALI	<i>acute lung injury</i>
AP	<i>activator protein</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphat</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COX	Cyclooxygenase
cPGES	<i>cytosolic PGE synthase</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
DIC	<i>disseminated intravasal coagulation</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECMO	<i>extra corporal membrane oxygenation</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	<i>et alter</i> (lat.) = und andere
FCS	<i>fetal calf serum</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>

Anhang

HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HRP	<i>horse radish proteine</i>
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I κ B	<i>inhibitors of κB</i>
IKK	I κ B-Kinasen
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
JNK	JUN N-terminale Kinase
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
LTB	Leukotrien B
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
memTNF	<i>membrane TNF</i>
MIP	Makrophagen-inflammatorisches Protein
mPGES	<i>membrane PGE synthase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chane reaction</i>
PEEP	<i>positive endexpiratory pressure</i>
PG	Prostaglandin

Anhang

PPAR	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
PPRE	<i>PPAR responsive element</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal t-cell expressed and secreted</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	<i>real time, Raumtemperatur</i>
RXR	<i>retinoic x receptor</i>
SEM	<i>standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwerts</i>
solTNF	<i>soluble TNF</i>
SP	<i>surfactant protein</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TACE	<i>TNF-α-converting enzyme</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TP-Rezeptor	Thromboxan-Prostanoid-Rezeptor
Tx	Thromboxan
u.a.	unter anderem
VCAM	<i>vascular adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
vs.	<i>versus (lat.) = gegen</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Einheiten

min	<i>minutes</i> = Minuten
h	<i>hours</i> = Stunden
d	<i>days</i> = Tage
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter

Anhang

l	Liter
pg	Pikogramm
ng	Nanogramm
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
g	Gramm
μ M	Mikromolar
mM	Millimolar
mm	Millimeter
rpm	<i>rotations per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
V	Volt
mA	Milliampere
W	Watt

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Die pulmonale Alveole
- Abb.2: Modell des NF- κ B-Signalwegs mit Darstellung des inhibitorischen Effekts durch PPAR α -Aktivierung
- Abb.3: Signalweg des PPAR
- Abb.4: Phospho-NF- κ B- und I κ B α -Expression in stimulierten AEC II
- Abb.5: COX-2-Expression in stimulierten AEC II
- Abb.6: COX-1-mRNA in stimulierten AEC II
- Abb.7: TxB₂- und TNF- α -Konzentration im Überstand von stimulierten AEC II
- Abb.8: MIP-2-Konzentration im Überstand und MIP-2-mRNA in stimulierten AEC II
- Abb.9: 15-PGDH- und mPTGES-mRNA in stimulierten AEC II
- Abb.10: COX-2-Expression in AEC II aus WT \pm WY 14,643 im Western Blot
- Abb.11: COX-2-Expression in AEC II aus PPAR α -KO \pm WY 14,643 im Western Blot
- Abb.12: COX-1-Expression in AEC II aus WT \pm WY 14,643 im Western Blot
- Abb.13: PGE₂ im Überstand von AEC II aus WT \pm WY 14,643
- Abb.14: PGE₂ im Überstand von AEC II aus PPAR α -KO \pm WY 14,643
- Abb.15: TxB₂ im Überstand von AEC II aus WT \pm WY 14,643
- Abb.16: TxB₂ im Überstand von AEC II aus PPAR α -KO \pm WY 14,643
- Abb.17: TNF- α im Überstand von AEC II aus WT \pm WY 14,643
- Abb.18: TNF- α im Überstand von AEC II aus PPAR α -KO \pm WY 14,643
- Abb.19: MIP-2 im Überstand von AEC II aus WT \pm WY 14,643
- Abb.20: MIP-2 im Überstand von AEC II aus PPAR α -KO \pm WY 14,643
- Abb.21: PPAR α -Expression in Lungenhomogenisat und isolierten AEC II

7.3 Tabellenverzeichnis

- Tab.1: Verwendete Primer für RT-PCR

7.4 Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, im Oktober 2014

Aniella Katharina Behnk

7.5 Danksagung

Ich möchte mich bei den Personen und mir nahestehenden Menschen bedanken, die besonderen Anteil an der Entstehung dieser Arbeit hatten:

Bei Herrn Prof. Dr. Konstantin Mayer, für die Überlassung des Themas, das Heranführen an die wissenschaftliche Arbeit und seine allzeit bereite fachliche und menschliche Unterstützung in den letzten 6 Jahren.

Bei Frau Dr. Juliane Ott, für die Einführung in die experimentelle Laborarbeit, stete Ermutigungen und eine Tasse Kaffee zur richtigen Zeit.

Bei Frau Andrea Mohr, der „guten Seele“ unseres Labors, für die Erleichterung vieler Arbeitsschritte, unermüdlichen Einsatz für geplagte Doktoranden und ein offenes Ohr in allen Lebenslagen.

Bei meiner Familie, die immer an mich glaubt, mich unterstützt und ohne die mein Studium, das Erlernen meines Berufs und vor allem diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere möchte Herrn Prof. Dr. Bertam Opalka für seine Hilfe und sein nimmermüdes Interesse an meinen wissenschaftlichen Fortschritten danken.

Ich danke meinen Eltern, Dr. Brigitte und Axel Behnk, für ihre bedingungslose Liebe und ihren Glauben an mich. Ohne euch wäre ich nicht die, die ich bin.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

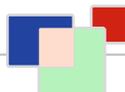
7.7 Publikationen und Vorträge

Hecker, M.; Behnk, A.; Morty, R.; Vadasz, I.; Herold, S.; Seeger, W.; Mayer, K. (2013): PPAR- α activation reduced LPS-induced inflammation in alveolar epithelial cells.
in Vorbereitung

„Anti-inflammatorische Effekte von Fibraten in murinen Alveolar Typ II Epithelzellen“
Kongress DGIM 2010 Wiesbaden, Vortrag und Poster beim Young Investigator Award

Schaefer, M. B.; Pose, A.; Ott, J.; Hecker, M.; Behnk, A.; Schulz, R.; Weissmann, N.; Günther, A.; Seeger, W.; Mayer, K. (2008): Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reduces inflammation and vascular leakage in a murine model of acute lung injury.

In: *Eur. Respir. J* 32 (5), S. 1344–1353.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6247-7



9 783835 1962477