

Der Einfluss von VEGF im Tiermodell der akuten respiratorischen Insuffizienz

Anja Buchbinder

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
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 linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

und

der Medizinischen Klinik II am Standort Gießen der
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Betreuer: Prof. Dr. Konstantin Mayer

**Der Einfluss von VEGF
im Tiermodell der akuten respiratorischen Insuffizienz**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Anja Buchbinder

Tierärztin aus Würzburg

Gießen, 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. M. Diener
Prof. Dr. K. Mayer

Tag der Disputation: 20.12.2013

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die akute respiratorische Insuffizienz.....	1
1.1.1.	Definition der akuten respiratorischen Insuffizienz.....	1
1.1.2.	Ursachen.....	2
1.1.3.	Pathophysiologie	2
1.1.4.	LPS-induzierte Signaltransduktion	4
1.1.5.	Transmigration von Leukozyten	6
1.1.6.	Lungenödem.....	9
1.1.7.	Zytokinsynthese	10
1.2.	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	13
1.2.1.	Vascular Endothelial Growth Factor.....	13
1.2.2.	VEGF Rezeptoren	13
1.2.3.	Biologische Wirkungen von VEGF	16
1.2.4.	VEGF in der Pathogenese verschiedener Krankheiten	18
1.3.	VEGF in der Lunge	19
1.3.1.	Physiologische Funktionen von VEGF in der Lunge.....	19
1.3.2.	Pathologische Effekte von VEGF in der Lunge.....	19
1.3.3.	VEGF im ARDS.....	21
1.4.	Fragestellung	22
2.	Material und Methoden	23
2.1.	Material	23
2.1.1.	Materialien für die Tierhaltung	23
2.1.2.	Geräte	23
2.1.3.	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	24
2.1.3.1.	Puffer ELISA.....	26
2.1.3.2.	Puffer FACS	27
2.1.4.	Antikörper	27
2.1.5.	Verwendete Kits und Assays.....	27
2.2.	Methoden.....	28
2.2.1.	Mäuse	28
2.2.1.1.	Tierhaltung	28
2.2.1.2.	Anästhesie	28

2.2.1.3.	Instillation von LPS bzw. VEGFA in die Trachea.....	28
2.2.1.4.	Applikation des FITC-markierten Ly-6G Antikörpers	29
2.2.1.5.	Blutentnahme und Bearbeitung.....	29
2.2.1.6.	Broncho-alveoläre Lavage (BAL).....	30
2.2.1.7.	Leukozyten-Zählung	30
2.2.1.8.	Differenzierung der Leukozyten	31
2.2.1.9.	Lungenentnahme und Bearbeitung.....	31
2.2.1.10.	Anfertigen von Schnitten	32
2.2.2.	In-vitro Methoden	33
2.2.2.1.	Laser-unterstützte Mikrodissektion (LMD)	33
2.2.2.2.	RNA Isolation	33
2.2.2.3.	cDNA Synthese und <i>Real-Time</i> PCR.....	33
2.2.2.4.	ELISA (TNF- α , MIP-2 und VEGF).....	36
2.2.2.5.	Proteinbestimmung in der BAL	37
2.2.2.6.	Histologie	37
2.2.2.7.	Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence activated cell sorting)	37
2.3.	Protokoll der Experimente	38
2.3.1.	Gruppeneinteilung.....	38
2.3.2.	Zeitverlauf	40
2.4.	Statistik.....	41
3.	Ergebnisse	42
3.1.	Tierzahlen.....	42
3.1.1.	Allgemeine Entzündungsanzeichen	42
3.1.2.	VEGF mRNA-Expression im Zeitverlauf.....	42
3.1.3.	Regulation der mRNA von VEGF und der Rezeptoren im Endothel nach LPS 43	
3.1.4.	Regulation der mRNA von VEGF und der Rezeptoren im Epithel nach LPS.	44
3.2.	Leukozytentransmigration.....	47
3.2.1.	Transmigration in den Alveolarraum	47
3.2.1.1.	Anzahl der Leukozyten in der BAL	47
3.2.1.2.	Differenzierung der Leukozyten in der BAL	48
3.2.2.	Transmigration in das Lungeninterstitium	50
3.2.2.1.	Anzahl der Leukozyten im Interstitium.....	50

3.2.2.2.	Differenzierung der Leukozyten im Interstitium	52
3.2.3.	Quantifizierung intravasaler und interstitieller Granulozyten.....	54
3.3.	Permeabilitätsstörung der alveolokapillären Barriere	56
3.4.	Zytokin-Synthese	58
3.4.1.	Tumor-Nekrose Faktor (TNF- α).....	58
3.4.2.	Makrophagen Inflammatorisches Protein (MIP-2)	60
3.5.	VEGF-Proteingehalt.....	62
3.5.1.	VEGF in der BAL	62
3.5.2.	VEGF im Blutplasma	63
3.6.	Leukozyten im peripheren Blut.....	65
3.6.1.	Anzahl der Blut-Leukozyten	65
3.6.2.	Differenzierung der Blut-Leukozyten	66
3.7.	Gewichtsverlauf	68
3.8.	Histologie	69
4.	Diskussion	71
4.1.	LPS-Instillation als Tiermodell des ARDS	71
4.2.	VEGF-Regulation im ARDS.....	72
4.3.	Auswirkungen auf die Leukozytenrekrutierung.....	74
4.4.	Effekt auf die Differenzierung der Leukozyten	75
4.5.	Veränderung der Permeabilität der alveolokapillären Barriere.....	77
4.6.	Zytokine als Inflammationsparameter.....	79
4.7.	Intervention mit Wachstumsfaktoren im ARDS	79
5.	Zusammenfassung.....	83
6.	Summary	84
7.	Literaturübersicht	85
8.	Tabellenverzeichnis.....	109
9.	Abbildungsverzeichnis	109
	Versicherung	111
10.	Danksagung.....	112

1. Einleitung

1.1. Die akute respiratorische Insuffizienz

1.1.1. Definition der akuten respiratorischen Insuffizienz

Die akute respiratorische Insuffizienz („*acute respiratory distress syndrome*“, ARDS) ist eine lebensbedrohliche Erkrankung mit einer Sterblichkeitsrate von über 40 Prozent (Ware and Matthay, 2000).

ARDS wird definiert als eine akute, diffuse, entzündliche Lungenfunktionsstörung, die mit einer erhöhten Permeabilität der Gefäße, erhöhtem Lungengewicht und Verlust an ventilertem Lungengewebe einhergeht. Die Kennzeichen sind Hypoxämie, bilaterale Infiltrate im Thoraxröntgen, erhöhte Totraumventilation und verminderte Lungencompliance. Morphologisch zeigt sich in der akuten Phase eine diffuse alveoläre Schädigung mit alveolärem Ödem, Bildung hyaliner Membranen, Hämorrhagien und Entzündung (Ware and Matthay, 2000).

Das Syndrom wurde 1967 erstmals beschrieben (Ashbaugh et al., 2005), danach waren viele unterschiedliche Definitionen gebräuchlich, wodurch eine Vereinheitlichung schwierig war. 1994 wurde erstmals eine einheitlich gültige Definition der akuten respiratorischen Insuffizienz durch die amerikanisch-europäische Konsensuskonferenz eingeführt. Damals wurde zwischen dem ARDS und dem weniger schwerwiegenden „*acute lung injury*“ (ALI) streng nach Oxygenierungsindex ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) unterschieden (Bernard et al., 1994).

2012 wurde eine neue Definition („Berlin Definition“) durch die ARDS Definition Task Force etabliert (Ranieri et al., 2012). Ab sofort wird zwischen leichtem, moderatem und schwerem ARDS unterschieden. Das Unterscheidungskriterium ist der Oxygenierungsindex ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$). Dabei wird der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) im Blut bestimmt und dieser dann durch die inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO_2) dividiert. Bei einem Oxygenierungsindex zwischen 200 und 300 mm Hg spricht man von mildem ARDS, bei 100 bis 200 mm Hg $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ handelt es sich um moderates ARDS und eine Oxygenierungsindex ≤ 100 mm Hg kennzeichnet die schwere Form der Insuffizienz. Weiterhin muss der Verlauf der Erkrankung akut sein, die Symptome also innerhalb einer Woche nach einem auslösenden Stimulus auftreten. Es darf kein

Herzversagen oder eine Überladung mit Flüssigkeit ursächlich für die Ödembildung sein und es müssen bilaterale Verschattungen im Thoraxröntgenbild zu sehen sein, die nicht nur auf das Ödem oder Knoten zurückzuführen sind (Ranieri et al., 2012).

1.1.2. Ursachen

Die Gründe für eine akute respiratorische Insuffizienz können vielfältig sein. Man unterscheidet zwischen direktem Lungenschaden einerseits, und sekundärer Lungenschädigung aufgrund extrapulmonaler Ursachen andererseits.

Eine direkte Schädigung der Lunge kann bedingt sein durch Pneumonien (bakteriell oder viral), Aspiration von Mageninhalt, Lungenkontusion, Embolien, Beinahe-Ertrinken, Inhalation toxischer Substanzen oder durch Beatmungstraumata. Extrapulmonale Auslöser des ARDS beinhalten Sepsis, schweres Trauma mit Schock und multiplen Verletzungen nach Unfällen, Transfusionen, Drogenüberdosis, akute Pankreatitis sowie operative Eingriffe (Hudson et al., 1995).

1.1.3. Pathophysiologie

Charakteristisch für das ARDS ist eine Schädigung von alveolärem Epithel und dem angrenzenden Endothel der Kapillaren. Dies führt zu einer Permeabilisierung der alveolokapillären Barriere mit Ausbildung eines Protein-reichen alveolären Ödems (Pugin et al., 1999). Weiterhin kommt es zur Aktivierung von Leukozyten, was zu einer Akkumulation von Leukozyten im Gefäßbett der Lunge sowie im Lungeninterstitium führt und im Folgenden zur Migration v.a. von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum. (Andonegui et al., 2003)

Die Schädigung der Epithelzellen hat oft dramatische Folgen. Der Transport von Flüssigkeit aus dem Alveolarraum ist gestört. Ebenso ist die Produktion von *surfactant* reduziert (siehe 1.1.6), was zu einem zunehmenden Kollaps der Alveolen und zu einer erleichterten Ausbreitung von Bakterien und Viren führt. Dies ist auf den Wegfall der Immunkompetenz der Surfactantproteine zurückzuführen. Das aktivierte Epithel sowie Leukozyten setzen proinflammatorische Mediatoren, wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Makrophagen-Inflammatorisches-Protein 2 (MIP 2) und Interleukine frei.

Neutrophile Granulozyten sind die dominierenden Leukozyten im ARDS, sie sind ein Indikator für das Ausmaß der Lungenschädigung (Pittet et al., 1997). Initial sind sie zur Bekämpfung von Mikroorganismen ein wichtiger Bestandteil der körpereigenen Abwehr, deshalb sind antiinflammatorische Therapieversuche bislang erfolglos geblieben. Im weiteren Verlauf tragen proinflammatorische Mediatoren, Sauerstoffradikale und Proteasen maßgeblich zur Entzündung bei.

Nach der akuten Phase kommt es bei vielen Patienten zu einem unkomplizierten Verlauf mit schneller Auflösung der Entzündung (Matthay, 1990). Bei einem Teil der Patienten entwickelt sich jedoch eine fibrosierende Alveolitis mit Deposition von extrazellulärer Matrix (Kollagen, Fibronectin), die mit einer erhöhten Mortalitätsrate einhergeht.

Das akute Lungenversagen stellt eine schwerwiegende Erkrankung mit hoher Sterblichkeitsrate dar. Die Inzidenz liegt in Deutschland bei ca. 3,5 – 4,5/100000 Menschen an einer schweren ARDS, die Letalität liegt bei 40–50 % (Esteban et al., 2002).

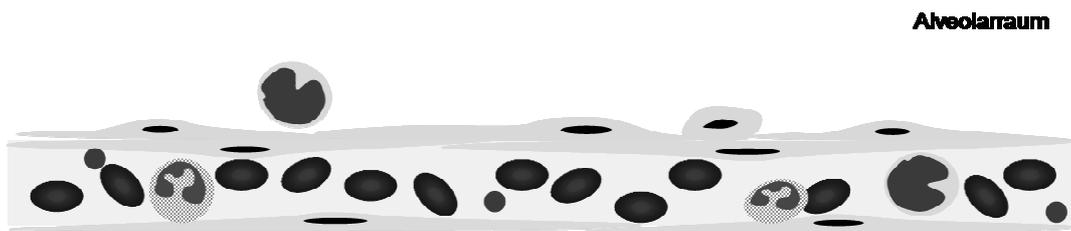


Abbildung 1 Schematische Darstellung der alveolokapillären Barriere im gesunden Organismus

Im Alveolarraum befinden sich wenige Alveolarmakrophagen, die Epithelzellen bilden eine dichte Barriere. Der Zwischenraum zwischen alveolärer Epithelzellschicht und Endothelzellschicht der Kapillaren ist physiologischerweise mikroskopisch dünn.

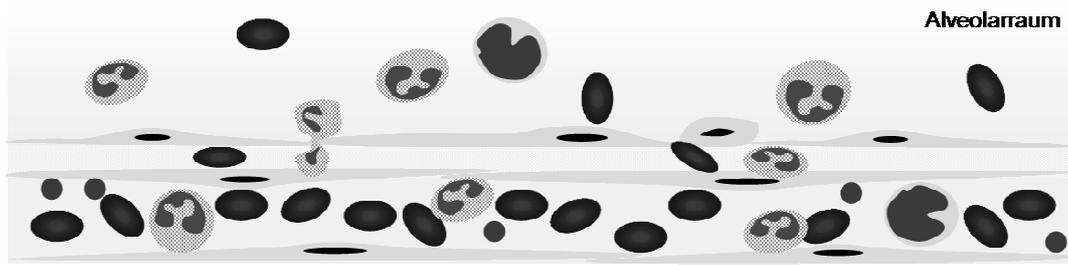


Abbildung 2 Schematische Darstellung der alveolokapillären Barriere im ARDS

Die Zerstörung der Integrität der Barriere führt zu einer Ansammlung von proteinreicher Ödemflüssigkeit in den Alveolen und im Lungeninterstitium. Blutleukozyten migrieren durch die Endothelschicht in das Lungeninterstitium und von dort weiter in den Alveolarraum. Erythrozyten wandern ebenfalls durch die gestörten Zellschichten.

1.1.4. LPS-induzierte Signaltransduktion

Lipopolysaccharide (LPS) sind thermostabile Verbindungen aus Fetten (Lipo-) und Zucker-Bestandteilen (Polysaccharide). Sie sind Wandbestandteil gramnegativer Bakterien, die vom Immunsystem als Antigen identifiziert und als Endotoxin wahrgenommen werden.

Strukturell ist der Lipidteil (Lipid A) von den Polysaccharid-Seitenketten, die stark variabel sind oder auch fehlen können, zu unterscheiden.

Lipid A ist bei fast allen gram-negativen Bakterien gleich, es ist als Kern des Moleküls für die immunologischen Funktionen verantwortlich und Bindestelle für LPS-bindendes Protein (LBP), das für die weitere Signalübertragung wichtig ist (Tobias et al., 1989).

Wird ein Organismus LPS ausgesetzt, so laufen immer gleiche Signalwege ab (Fenton and Golenbock, 1998; Schumann et al., 1994b; Schumann et al., 1994a). LPS wird von verschiedenen Molekülen auf der Zellmembran von Leukozyten erkannt und gebunden, dazu gehören CD14, der *macrophage scavenger receptor* (SR) und die B2-Leukozyten Integrine.

Da LPS nur schwer diffundiert und in wässriger Umgebung Aggregate bildet, benötigt es das LPS-bindende Protein (LBP), um die Bindung an die Rezeptoren herzustellen (Hailman et al., 1994). LBP fungiert als Lipid-Transfer-Protein und transferiert LPS einerseits auf die Membranrezeptoren der Immunzellen, andererseits aber auch auf Lipoproteine, wodurch seine biologische Aktivität neutralisiert wird (Skarnes, 1966).

LBP ist ein Akute-Phase-Protein, das hauptsächlich in der Leber produziert wird, zum Teil aber auch in der Lunge. Der Plasma-Spiegel steigt bei entzündlichen Geschehen stark. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass bei Patienten mit ARDS die LBP-Level in der bronchoalveolären Lavage (BAL) stark erhöht waren (Martin et al., 1997).

CD14 ist ein Glykoprotein auf der Oberfläche mononukleärer Zellen sowie neutrophiler Granulozyten (Goyert et al., 1986; Wright et al., 1990).

Bindet LPS an CD14 kann jedoch keine direkte transmembrane Aktivierung erfolgen, da CD14 ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-gebundenes Protein ist. Es erfolgt ein Transfer auf den TLR4–MD-2 (*toll-like-receptor 4 - lymphocyte antigen 96*) Komplex (da Silva et al., 2001; Shimazu et al., 1999).

Der TLR4 ist der Haupt-Rezeptor für die durch LPS ausgelösten Effekte (Andonegui et al., 2003). Über MyD88, das „*myeloid differentiation primary response gene 88*“, werden nun weitere Kinasen aktiviert, unter anderem die Interleukin-1 Rezeptor–assoziierte Kinase (IRAK). Diese wiederum aktiviert den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF 6). Die Kinasen phosphorylieren den Inhibitor (I κ B) des Nukleären Faktors– κ B (NF- κ B). Dadurch kommt es zur Abspaltung des Inhibitor-Komplexes und folglich zur Aktivierung des pro-inflammatorisch wirkenden Transkriptionsfaktors NF- κ B. Durch die Translokation von NF- κ B aus dem Zytosol in den Zellkern wird die Transkription von pro-inflammatorischen Zielgenen initiiert. Gene, die unter anderem durch NF- κ B reguliert werden sind die pro-inflammatorischer Mediatoren und Zytokine, wie z.B. TNF- α oder Interleukin (IL)-8 (Han et al., 2002; Poynter et al., 2003), denen wiederum im ARDS eine Schlüsselrolle zukommt.

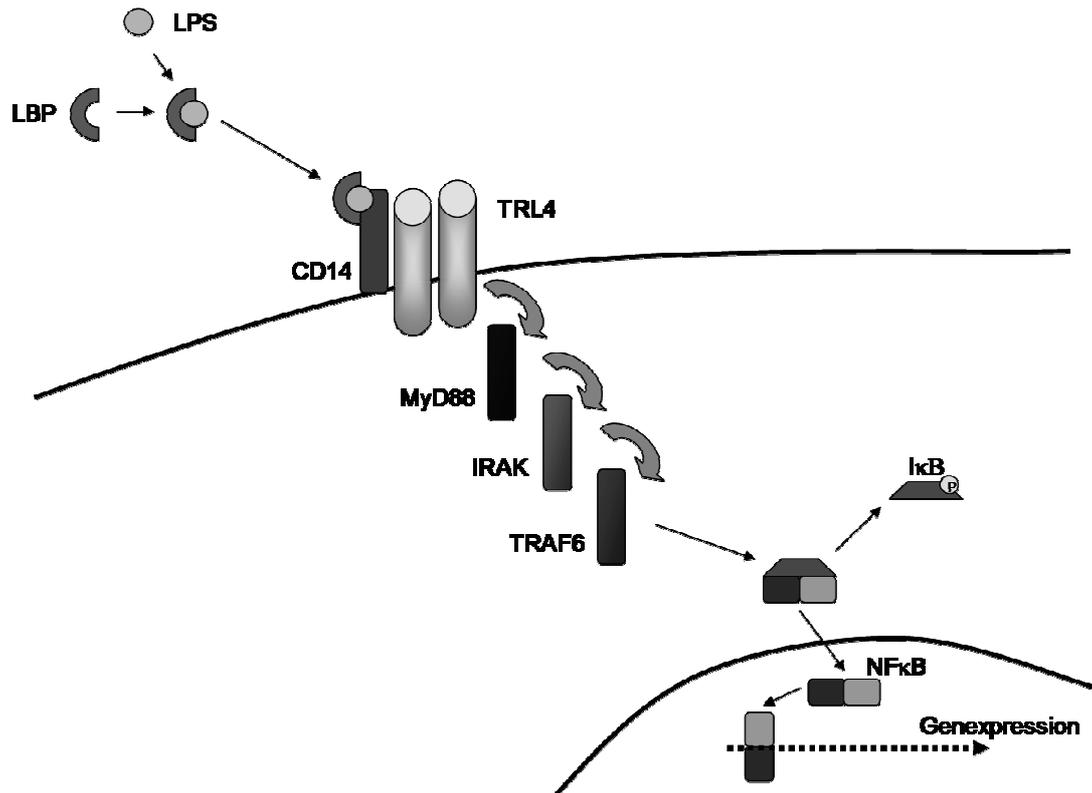


Abbildung 3 LPS-Signalkaskade

LPS bindet an LBP, dieser Komplex wird dann auf das membrangebundene CD14 übertragen. Über den TLR4 wird das Signal ins Innere der Zelle weitergegeben, die Signaltransduktion erfolgt über MyD88, IRAK und TRAF6. Durch Phosphorylierung wird IκB abgespalten und somit NF-κB aktiviert. Nach Translokation in den Zellkern lagert sich NF-κB an die DNA an und führt zur proinflammatorischen Genexpression. (Darstellung modifiziert nach (Cohen, 2002))

1.1.5. Transmigration von Leukozyten

Die Migration von Leukozyten aus dem Gefäßsystem an den Ort eines entzündlichen Geschehens ist einer der wichtigsten Schritte zur Bekämpfung einer Infektion.

Durch die besondere Anatomie der Lunge ist dieser Vorgang nicht mit der Transmigration von Leukozyten in anderen Organen zu vergleichen, bei denen die Leukozyten-Migration in den postkapillären Venolen stattfindet.

In der Lunge finden diese Vorgänge im Kapillarbett selbst statt. Die Kapillaren weisen einen Durchmesser von 2 – 15 µm auf, der Durchmesser von Neutrophilen Granulozyten (PMN) liegt bei 6 – 8 µm (Doerschuk et al., 1993). Die Granulozyten müssen also physiologischerweise ihre Form verändern, um das Kapillarbett zu passieren (Downey et

al., 1990). Die mittlere Passagezeit ist daher mit 6,1 Sekunden auch deutlich länger als die eines Erythrozyten (1,4 – 4,2 Sekunden). Dies führt dazu, dass sich im Kapillarbett der Lunge ca. 50-fach mehr PMN befinden als im systemischen Kreislauf (Doerschuk et al., 1987; Doerschuk et al., 1990a; Downey et al., 1993; Lien et al., 1991).

Bei Bindung chemotaktischer Mediatoren (z.B. Interleukin-8) reagieren die Granulozyten mit einer massiv erhöhten Rigidität (Buttrum et al., 1994; Downey et al., 1993). Die Formänderung zur Passage der Kapillaren ist nun nicht mehr möglich, die Zellen werden somit mechanisch im Kapillarbett gestoppt und lokal an der Alveolarwand konzentriert. Im Gegensatz zu den anderen Organsystemen werden hier weder L-Selektin noch β_2 -Integrine benötigt (Doyle et al., 1997).

Nach der initialen Sequestration der Granulozyten werden weitere Vorgänge durch Adhäsionsmoleküle beeinflusst, hier v.a. durch die Interaktion zwischen Leukozyten-Adhäsionsmolekülen mit Endothel-Adhäsionsmolekülen. Doerschuk et. al zeigten 1990, dass es nun zwei Signalwege für die endotheliale Leukozytentransmigration gibt, einen β_2 -Integrin-abhängigen und einen -unabhängigen Weg, je nach Art des Stimulus. Im Modell der LPS mediierten Inflammation handelt es sich um einen β_2 -Integrin-abhängigen Signalweg (Doerschuk et al., 1990b).

Integrine sind transmembrane, heterodimere Glykoproteine, die mit Immunglobulin-ähnlichen Glykoproteinmolekülen interagieren können. Sie ermöglichen den Kontakt zu anderen Zellen und der extrazellulären Matrix.

Erstaunlich ist, dass bei der β_2 -Integrin-abhängigen Signaltransduktion immer noch 20-30 % der Migration Integrin-unabhängig erfolgen. Die Adhäsionsmoleküle, die bei der transendothelialen Migration in der Lunge eine Rolle spielen, sind PECAM-1 (*platelet endothelial adhesion molecule-1*, CD31), JAMs (*junctional adhesion molecules*), VE-Cadherin (*vascular endothelial-cadherin*) und CD99 (Burns et al., 2003).

PECAM-1 ist ein Protein der Immunglobulin-Familie und ist auf Endothelzellen, Thrombozyten und Leukozyten exprimiert. Bei Inhibition dieses Moleküls durch Antikörper konnte *in-vitro* 80- 90 % der Transmigration geblockt werden. Bei PECAM-1 *knock-out* Mäusen wird dies jedoch durch andere Mechanismen kompensiert (Muller, 2001).

JAMs sind ebenfalls Proteine der Immunglobulin-Familie; bisher sind 3 verschiedene Proteine (JAM-1 – 3) bekannt. Bisher scheint allerdings nur JAM-1 eine Rolle bei der Transmigration in der Lunge zu spielen, JAM-2 und -3 sind nicht ausreichend erforscht.

JAM-1 ist auf Epithelzellen (apikal), Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen exprimiert und an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, die genaue Funktion ist aber noch unklar (Martin-Padura et al., 1998).

VE-Cadherin (Cadherin 5) ist ebenfalls auf Endothelzellen in den interendothelialen Spalten exprimiert. Ihm kommt eine wichtige Rolle im Erhalt der Integrität der endothelialen Barriere zu (Corada et al., 1999). Eine Blockade durch Antikörper führt zur Migration von Leukozyten. Migrierende Leukozyten „schieben“ VE-Cadherin bei ihrer Wanderung zur Seite, das verdrängte Material füllt danach das Loch schnell wieder auf (Steinberg and McNutt, 1999).

CD99 ist ein Typ-I-Transmembranprotein, das auf Leukozyten und Endothelzellen vorkommt. Dort lokalisiert es an Zell-Zell-Kontakten. Eine Blockade führt zur Hemmung der Migration von Monozyten, die Wirkung auf Granulozyten ist noch nicht untersucht (Schenkel et al., 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass ca. 50 % der Leukozyten an trizellulären Zellgrenzen, also Grenzen an denen 3 Zellen aufeinander treffen, migrieren. 25 % wandern an bizellulären Zellgrenzen, zwischen zwei Endothelzellen, aus und wiederum 25 % bevorzugen transzelluläre Wege, d.h. durch das Zytoplasma von einzelnen Endothelzellen (Burns et al., 1997).

An trizellulären Grenzen sind die eigentlich dichten interendothelialen Zellkontakte (*tight junctions*) „löchrig“, dies zeigt sich an einer verminderten Ausprägung der Kontaktproteine (Occludin, Zona occludens-1, -2) (Burns et al., 2000).

Bei der Diapedese (Wanderung) der Zellen durch bizelluläre Zellkontakte öffnen sich die *tight junctions* wie eine Art Vorhang und schließen sich direkt wieder (Shaw et al., 2001). Die Regulation der transzellulären Migration ist bisher unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass VEGF (*vascular endothelial growth factor*) endotheliale Lücken induziert (Roberts and Palade, 1995). Diese transzellulären Poren entstehen durch Fusion sogenannter Caveolae der Endothelzellen. Diese Caveolae sind stark mit dem Rezeptor für VEGF besetzt (Feng et al., 1999). Weiterhin befindet sich VEGF in den Granula neutrophiler Granulozyten und wird bei Stimulation schnell ausgeschüttet, was zu einer sehr schnellen, massiven Erhöhung der Permeabilität führt (Gaudry et al., 1997; Taichman et al., 1997).

Warum die einzelnen Zellen ihren jeweiligen Migrationsort wählen, konnte bisher nicht gezeigt werden. Die Signalwege bedürfen weiterer Forschung.

Nach der Migration durch das Endothel wandern die Leukozyten durch existierende Lücken in der Basalmembran, die Proteasen der Granulozyten spielen hierbei keine Rolle (Parkos, 1997). Es konnte aber gezeigt werden, dass die Fibroblasten im Interstitium eine Art Führungsfunktion einnehmen und die Leukozyten entlang ihrer Ausläufer wandern (Behzad et al., 1996).

Zur Migration durch die extrazelluläre Matrix gibt es keine weiteren Informationen, ebenso weiß man nur wenig zur transepithelialen Migration. Zwar sind Adhäsionsmoleküle auf Epithelzellen ausgeprägt, doch nur auf der apikalen Seite. Die Migration der Leukozyten erfolgt aber von basal in Richtung apikal, daher sind diese Moleküle nicht von Bedeutung. Es konnte aber gezeigt werden, dass Leukozyten, ebenso wie bei der transendothelialen Migration, trizelluläre Grenzen bevorzugen, hier vor allem Grenzen zwischen zwei Typ-I und einem Typ-II Pneumozyten (Damiano et al., 1980). Diese trizellulären Grenzen weisen ebenfalls Diskontinuitäten in den *tight junctions* auf. Weitere Signalwege und eventuelle Adhäsionsmoleküle sind für das Lungenepithel bisher nicht bekannt.

1.1.6. Lungenödem

Die Regulation des Flüssigkeitshaushaltes ist im gesamten Körper eng reguliert. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen Filtration aus dem Blutkreislauf einerseits und Abtransport dieser Flüssigkeit über die Lymphgefäße andererseits. Reguliert wird dies durch hydrostatische und kolloidosmotische Gradienten, wobei die Fließrichtung der Flüssigkeit über die Druckunterschiede zwischen Gefäßsystem und Interstitium bestimmt wird (Bhattacharya et al., 1984).

Das Endothel bildet eine wichtige Barriere zwischen vaskulärem und interstitiellem Kompartiment. In der Lunge unterscheidet man zwischen „dünnen“ und „dicken“ Segmenten der Blut-Luft-Schranke. Der Gasaustausch findet vorwiegend in den dünnen Teilen statt, in denen die flache Endothelschicht sich mit der alveolären Epithelschicht eine verschmolzene Basalmembran teilt. In den dicken Anteilen befinden sich zwischen den Basalmembranen noch extrazelluläre Matrix, Fasern und einzelne Fibroblasten. Hier findet

vor allem der Austausch von Flüssigkeit, Proteinen und anderen Molekülen statt (Murray, 2010).

Verschiedene Krankheiten werden durch eine Störung dieser Regulationsmechanismen ausgelöst. Die Reduktion des Flüssigkeitstransports in den Alveolarraum etwa durch eine Mutation von Ionenkanälen führt zur Mukoviszidose, einer schwerwiegenden Erberkrankung mit eingeschränkter Lebenserwartung beim Menschen. Bei einer Erhöhung der Flüssigkeitsfiltration in die Lunge, die über die Kompensationsmechanismen der Resorption hinausgeht, spricht man von einem Lungenödem.

Dies kann nun mehrere Ursachen haben. Man unterscheidet das kardiogene Ödem von nicht kardiogenen Ödemursachen. Beim kardiogenen Ödem wird durch einen Anstieg des pulmonären kapuillären Drucks mehr Flüssigkeit in das Lungengewebe gepresst als resorbiert werden kann. Dies ist z.B. eine Folge von Linksherzversagen (Gropper et al., 1994).

Bei einem nicht-kardiogenen Lungenödem liegt eine Permeabilitätsstörung von Endothel und auch Alveolarepithel vor, was zu einem Austritt von Flüssigkeit und korpuskulären Bestandteilen aus dem Blut in den Alveolarraum und das Lungeninterstitium führt (Aukland and Reed, 1993). Dieses proteinreiche Transsudat führt zur Störung des Gasaustausches durch eine massive Erhöhung der Diffusionsbarriere. Durch die Störung des alveolären Flüssigkeitsfilms wird auch das *surfactant* (*surface active agent*) verdünnt und durch Proteine, wie z.B. Gerinnungsfaktoren, inaktiviert. *Surfactant* ist eine Mischung aus Phospholipiden und Proteinen und dient zum einen der Reduzierung der Oberflächenspannung in den Alveolen, zum anderen erfüllt es auch wichtige immunologische Funktionen (Gunther et al., 2001).

1.1.7. Zytokinsynthese

Zytokine sind Mediatoren des Immunsystems. Sie werden von aktivierten Zellen, wie Monozyten und Makrophagen, sezerniert und übermitteln inflammatorische Reize an Effektorzellen. Ihnen kommt in der Pathogenese des ARDS eine Schlüsselrolle zu.

Alveolarmakrophagen befinden sich physiologischerweise in den Alveolen um inhalede Pathogene zu bekämpfen und Partikel zu phagozytieren. Sie sind die initialen Zellen der angeborenen Immunantwort (Beck-Schimmer et al., 2005). Bei Aktivierung sezernieren sie Zytokine, darunter Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α und Interleukin (IL)-1 β .

Sowohl TNF- α als auch IL-1 β werden nach einem inflammatorischen Stimulus, z.B. LPS, innerhalb sehr kurzer Zeit ausgeschüttet und führen zur Aktivierung membranständiger, spezifischer Rezeptoren. Dies führt zu Symptomen wie Fieber, Tachykardie, Hyperventilation und Gefäßerweiterung und verursacht die Synthese weiterer Zytokine, was eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten sowie eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Leukozyten zur Folge hat (Beasley et al., 1989; Okusawa et al., 1988). Dies wurde nicht nur in experimentellen Modellen, sondern auch in ARDS-Patienten nachgewiesen (Siler et al., 1989).

TNF- α und IL-1 β führen zur Ausschüttung von IL-6 durch Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen (Damas et al., 1989; Steinmetz et al., 1995). IL-6 stimuliert Akute-Phase-Proteine wie C-reaktives Protein und bewirkt eine Aktivierung der Komplementkaskade (Bone, 1996). Darüber hinaus bewirkt es die Ausschüttung von *corticotropin-releasing hormone* (CRH), welches in der Nebennierenrinde die Cortisolsynthese steigert. Cortisol bewirkt eine negative Rückkopplung für IL-6, über eine Hemmung der Produktion in Monozyten und Fibroblasten (Heinrich et al., 1990).

Transforming growth factor (TGF)- β ist ein weiterer Mediator, der eine wichtige Rolle im ARDS spielt. Es ist vor allem für die Resolution der Entzündung entscheidend, da es einer der Schlüssel-Mediatoren für Fibrose ist (Broekelmann et al., 1991). Auch konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von TGF- β durch Antikörper Mäuse vor LPS- und Bleomycin-induziertem Lungenversagen schützt (Giri et al., 1993).

Doch nicht nur pro-inflammatorische Botenstoffe, sondern auch anti-inflammatorische Mediatoren spielen eine Rolle im ARDS. So setzen aktivierte Endothelzellen *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) frei, der aktivierend auf Makrophagen und Endothelzellen wirkt. Dieser Wachstumsfaktor ist bedeutend für die Funktion der Alveolarmakrophagen, die Lungenimmunabwehr und die *surfactant*-Homöostase (Trapnell and Whitsett, 2002).

Das murine *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2) entspricht dem humanen IL-8. MIP-2 bzw. IL-8 sind Chemokine der CxC-Familie und werden nach Induktion von Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten produziert. Chemokine sind kleine Proteine, die an G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden und chemotaktische sowie aktivierende Effekte auf Leukozyten-Subpopulationen haben.

Man unterscheidet zwei Gruppen von Chemokinen, die CC-Chemokine einerseits und die CxC-Chemokine andererseits. Bei CC-Chemokinen liegen die ersten beiden Cystein-Reste direkt aneinander, sie wirken hauptsächlich auf Monozyten. Zu dieser Gruppe gehört unter anderem *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1. In der Gruppe der CxC-Chemokine werden die ersten beiden Cystein-Reste durch eine weitere Aminosäure verbunden. Zu dieser Gruppe gehört IL-8 bzw MIP-2, die hauptsächlich auf neutrophile Granulozyten wirken, durch Förderung der Chemotaxis sowie durch Expression von Adhäsionsmolekülen (Weber, 2003; Wolpe et al., 1989).

1.2. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

1.2.1. Vascular Endothelial Growth Factor

Die VEGF-Familie besteht aus fünf Proteinen, die funktional und strukturell verwandt sind, VEGF-A, -B, -C, -D und *placental growth factor* (PGF). VEGF-A ist das wichtigste und auch das am besten untersuchte Molekül dieser Familie, es wird im Folgenden als VEGF bezeichnet (Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991).

Das Gen des VEGF-A weist acht Exons und sieben Introns auf, durch alternatives *splicing* entstehen vier Isoformen mit 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren. VEGF₁₂₁ ist ein freies Protein, das leicht diffundiert und keine Heparin-Bindestelle mehr aufweist. VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ sind basische Proteine, die vor allem in der extrazellulären Matrix (ECM) zu finden sind. Beide weisen eine hohe Affinität zu Heparin auf. VEGF₁₆₅ ist die am häufigsten vorkommende Isoform von VEGF, es wird sezerniert, kommt aber auch membrangebunden und in der ECM vor. Ihm kommt also eine intermediäre Stellung zu. Bei der Maus sind die Isoformen jeweils eine Aminosäure kürzer als beim Menschen (Houck et al., 1992).

Die Genexpression von VEGF wird über die Sauerstoff-Sättigung und Wachstumsfaktoren gesteuert. Ein niedriger Sauerstoff-Gehalt führt zur Induktion des *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 der wiederum ein wichtiger Transkriptionsfaktor für das VEGF-Gen ist. So wird sichergestellt, dass in Gewebe mit zu niedriger Sauerstoffversorgung neue Gefäße einsprossen, was durch VEGF reguliert wird (Dor et al., 2001).

Mehrere Wachstumsfaktoren sowie Onkogene wie *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor* (TGF)- α , TGF- β , *keratinocyte growth factor* (KGF), *insulin-like growth factor* (IGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), sowie die proinflammatorischen Interleukine IL-1 α und IL-6 haben einen stimulierenden Effekt auf die VEGF mRNA Expression (Neufeld et al., 1999).

1.2.2. VEGF Rezeptoren

Es gibt drei VEGF Rezeptoren, VEGFR1-3, sowie Isoform-spezifische Co-Rezeptoren, die Neuropiline und Heparansulfat. Der VEGFR3 ist im Rahmen dieser Arbeit nicht relevant,

da an ihn nur VEGFC und VEGFD binden und er hauptsächlich in lymphatischen Gefäßen zu finden ist (Karkkainen et al., 2002).

Die beiden anderen Rezeptoren sind Tyrosin-Kinasen, die einander sehr ähnlich sind. Sie weisen eine extrazelluläre Domäne mit sieben Immunglobulin-ähnlichen Domänen auf, eine transmembrane Region und eine Tyrosin-Kinase-Sequenz (Shibuya et al., 1990; Terman et al., 1991). Der VEGFR1 wird auch als Flt-1 (*Fms-like tyrosine kinase 1*) bezeichnet, der VEGFR2 als Flk-1 oder KDR (*fetal liver kinase 1, kinase-insert domain-containing receptor*). Beide Rezeptoren binden VEGF mit hoher Affinität, dies kann durch freies VEGF erfolgen oder durch Präsentation durch einen Co-Rezeptor. Daraufhin erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors zu einem Homo- oder Heterodimer, was für die Aktivierung notwendig ist (Dosch and Ballmer-Hofer, 2010; Nilsson et al., 2010). Die Übertragung der Signale erfolgt bei beiden Rezeptoren durch eine Phosphorylierung verschiedener Tyrosin-Reste.

Flt-1 wird vornehmlich in vaskulären Endothelzellen exprimiert, aber auch andere Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC), dendritische Zellen und Tumorzellen weisen Flt-1 auf. (Koch et al., 2011)

Durch alternatives *splicing* entsteht eine weitere Form von Flt-1, die nicht mehr membrangebunden ist. Diese wird als löslicher Flt-1 (sFlt-1) bezeichnet. Dieser sFlt-1 übermittelt natürlich keine intrazellulären Signale und wird daher als ein endogener Inhibitor von VEGF angesehen (Kendall and Thomas, 1993).

Flt-1 ist in der Embryogenese sowie im Neugeborenen wichtig, bei fortschreitendem Lebensalter wird der Rezeptor weniger benötigt. Die Expression ist im adulten Organismus, sowohl beim Tier als auch beim Menschen, erneut erhöht. In der Promotor-Region von Flt-1 findet sich eine HIF-1 α Bindungsstelle, dies lässt auf eine Aktivierung der Genexpression unter hypoxischen Bedingungen schließen.

Der aktivierte Flt-1 wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und nicht *recycled*, sondern degradiert (Kobayashi et al., 2004).

Flk-1 wird ebenfalls stark in der Embryogenese exprimiert, dies unterstreicht seine Bedeutung in der Vaskulogenese. Im adulten Organismus zeigt sich erneut eine vermehrte Expression, es gibt Hinweise, dass KDR dann eine neuroprotektive Wirkung hat. Flk-1 hat ebenfalls eine durch alternatives *splicing* entstandene lösliche Form, den sVEGFR2, der in

verschiedenen Geweben und im Plasma nachweisbar ist und eine Wirkung auf die Reifung von Gefäßen ausübt (Lorquet et al., 2010).

In der Promotor-Region von Flk-1 findet sich jedoch keine Bindungsstelle für HIF-1 α , die Expression wird folglich nicht durch diesen Transkriptionsfaktor reguliert (Gerber et al., 1997).

Aktivierung von Flk-1 führt zur Ablösung des Rezeptors von Caveolin-1 und zu einer Translokation in Endosomen (Salikhova et al., 2008). Alternativ wird Flk-1 durch Endozytose in Caveosomen aufgenommen (Labrecque et al., 2003).

Im Gegensatz zu Flt-1 wird dieser Rezeptor nur zum Teil degradiert, der Rest wird *recycled* und zur Plasmamembran zurück transportiert. Die Degradierung hängt von posttranslationalen Modifikationen wie Ubiquitinierung und Phosphorylierung ab (Singh et al., 2005; Ewan et al., 2006).

Flk-1 wird in Endothelzellen in Vesikeln gespeichert und nach Stimulation mit VEGF zur Plasmamembran transportiert (Gampel et al., 2006).

VEGF hat eine etwa 10-fach höhere Affinität zu VEGFR1 als zu VEGFR2. Die Kinase von Flt-1 ist in Endothelzellen im adulten Organismus normalerweise nicht aktiv, Flt-1 könnte also als ein "Decoy"-Rezeptor fungieren, der überschüssiges VEGF bindet, so sequestriert und seine biologische Aktivität verhindert (Waltenberger et al., 1994).

In Monozyten und Makrophagen ist Flt-1 jedoch aktiv, eine Aktivierung des Rezeptors durch Phosphorylierung führt in diesen Zellen zur Migration durch Chemotaxis (Clauss et al., 1996; Barleon et al., 1996). PGF fördert die biologische Verfügbarkeit von VEGF, wahrscheinlich durch Bindung an den Flt-1, wodurch VEGF frei wird und die Bindung an Flk-1 möglich wird (Park et al., 1994).

Werden Flt-1 und Flk-1 gemeinsam exprimiert, bilden sie bei Aktivierung Heterodimere welche 10 - 50 % der aktiven Signalkomplexe ausmachen (Huang et al., 2001).

VEGF wird weiterhin durch Co-Rezeptoren gebunden. Hier sind v.a. die Neuropiline (NRP) 1 und 2 sowie Heparansulfat (HS) von Bedeutung (Grunewald et al., 2010).

In verschiedenen Tumor-Zelllinien, bei denen keine Expression von VEGF-Rezeptoren bekannt war, sowie in humanen Nabelstrang-Endothelzellen (HUVEC) wurden VEGF Rezeptoren nachgewiesen, die nur die Isoformen VEGF₁₄₅ und VEGF₁₆₅ binden (Soker et al., 1996; Soker et al., 1998). Dies sind NRP1 und 2. Beides sind hochkonservierte transmembrane Proteine mit unterschiedlicher Verteilung. So kommt bei arteriellen

Endothelzellen hauptsächlich NRP1 vor, bei venösen und lymphatischen Endothelzellen v.a. NRP2 (Herzog et al., 2001).

NRP1 verstärkt die Wirkung von Flk-1 auf Endothelzellen, auch ist die Bindungsaffinität der Flk-1/NRP1 Komplexe zu VEGF deutlich höher als die von Flk-1 allein. Die genauen Mechanismen, wie Neuropiline die Bioaktivität von VEGF beeinflussen sind bislang aber nicht geklärt. Neuropiline binden allerdings eine Vielzahl von Liganden und interagieren mit vielen verschiedenen Rezeptoren und Co-Rezeptoren, ihre Wirkung ist demnach nicht von VEGF allein abhängig (Fuh et al., 2000; Soker et al., 2002; Whitaker et al., 2001).

Heparansulfat bindet an VEGF, sowie an alle Rezeptoren und NRP1. Die VEGF-Isoform 121 ist die einzige Isoform, bei der keine Bindung möglich ist, da hier die Bindungsstelle fehlt. HS-Proteoglykanen (HSAGs) Bindung an VEGF/Rezeptor-Komplexe führt zu einer Stabilisierung dieser Komplexe und so zu einer Verstärkung der Signalübertragung (Stringer, 2006). Weiterhin präsentieren HSPGs VEGF zu Flk-1 und führen so ähnlich wie bei den Neuropilinen zu einer Verstärkung des Signals (Jakobsson et al., 2006).

1.2.3. Biologische Wirkungen von VEGF

VEGF ist ein wichtiger Überlebensfaktor für Endothelzellen, der über den Phosphoinositid (PI)-3 Kinase - Akt Signalweg vermittelt wird. Die Aktivierung sowohl des Flt-1 als auch des Flk-1 führt zu einer Aktivierung der PI3K, diese dann zur Aktivierung von Akt (Protein Kinase B). Akt kann BAD (*Bcl-2 associated death promoter*) phosphorylieren, wodurch es vom Bcl-2/Bcl-X Komplex dissoziiert und so das pro-apoptotische Potential verloren geht (Song et al., 2005).

Weiterhin induziert VEGF die Expression anti-apoptotischer Proteine wie z.B. Bcl-2 oder A1 (Gerber et al., 1998a; Gerber et al., 1998b; Farahani et al., 2005) und inaktiviert Caspase-9 durch Induktion der Phosphorylierung (Cardone et al., 1998).

Außerdem spielt VEGF eine wichtige Rolle für die Chemotaxis von Monozyten (Clauss et al., 1990) und ist ein sehr potenter Permeabilitätsfaktor (Senger et al., 1983).

VEGF ist ein äußerst wichtiger Mediator für die Proliferation von Zellen. Hier spielt die Aktivierung von Phospholipase C γ (PLC γ) eine Schlüsselrolle. Sie aktiviert Proteinkinase C (PKC) und so zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK). MAPK sind wichtige Mediatoren für die Regulation von Permeabilität und Proliferation.

VEGF gehört zu den potentesten vaskulären Permeabilitätsfaktoren (Zachary, 2001; Takahashi et al., 1999).

In der embryonalen Entwicklung spielt VEGF eine Rolle in der Vaskulogenese, VEGF defiziente Tiere sind nicht lebensfähig und leiden unter massiven Abnormalitäten u.a. in der Organentwicklung (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996).

Auch in der frühen postnatalen Periode ist VEGF für die weitere Organentwicklung sowie das Wachstum, hier vor allem Skelettwachstum und Knochenformation, unentbehrlich (Gerber et al., 1999b; Gerber et al., 1999a).

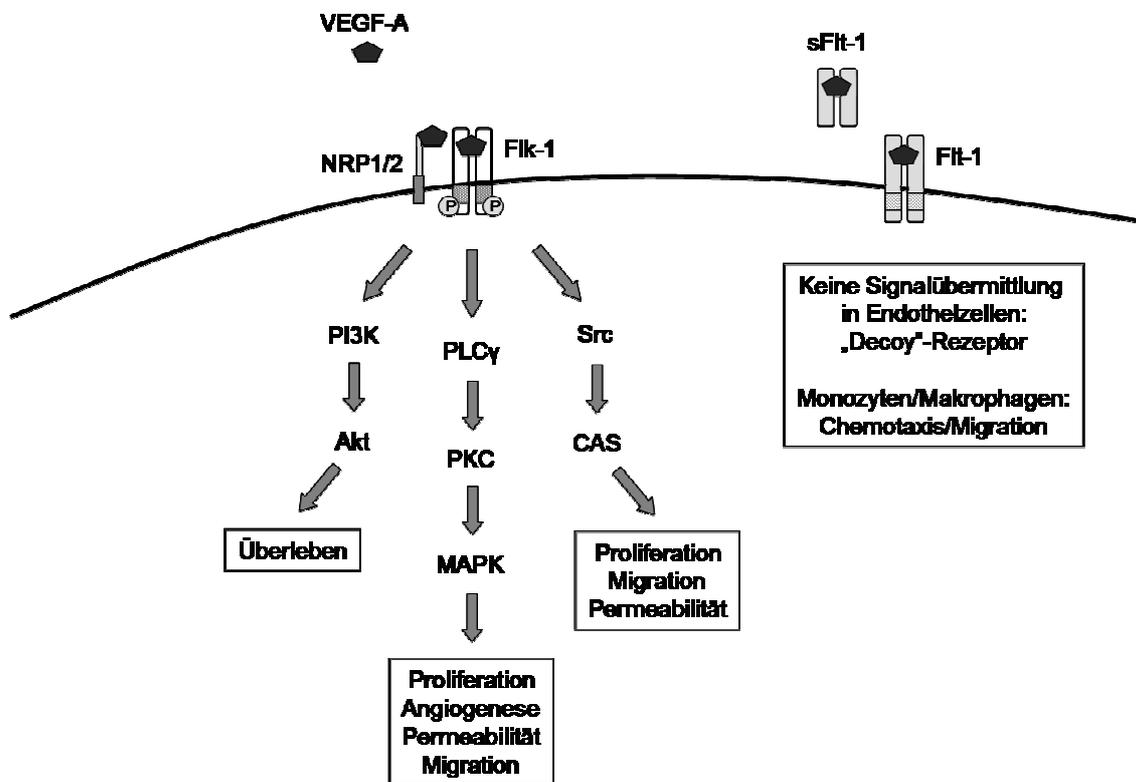


Abbildung 4 Die Signalwege von VEGF im adulten Organismus

VEGF bindet an den Rezeptor Flt-1 und wird so sequestriert, es findet in Endothelzellen keine Signalübertragung statt, in Makrophagen führt die Aktivierung des Rezeptors zu einer Migration. Nach Bindung an den Flk-1, mit oder ohne Hilfe durch die Neuropiline, werden verschiedene Tyrosine phosphoryliert. Die folgenden Signalkaskaden sind zum einen der PI3K/Akt Weg, der für das Überleben der Zellen von Bedeutung ist, dann der PLC/PKC/MAPK Weg sowie die Src/CAS Kaskade, die v.a. für Proliferation und Permeabilität eine Rolle spielen. (Valdes et al., 2008)

1.2.4. VEGF in der Pathogenese verschiedener Krankheiten

VEGF spielt bei diversen pathologischen Geschehen eine wichtige Rolle.

Vor allem bei malignen Neoplasien, seltener auch bei gutartigen, wird VEGF häufig durch die Hypoxie im Zentrum solider Umfangsvermehrungen produziert und führt so zur Neovaskularisation des Tumorgewebes. Die Tumore werden so mit Blut und dadurch mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und werden nicht in ihrem Wachstum behindert.

Weiterhin ist VEGF in der Pathogenese der altersabhängigen feuchten (exsudativen) Makuladegeneration (wAMD) von fundamentaler Bedeutung. Hier führt eine erhöhte VEGF Expression zu einer Vaskularisation der Retina von der darunterliegenden Choroidea. Die Gefäße der Choroidea sind anders aufgebaut als die retinalen Blutgefäße, die vermehrte VEGF Expression führt daher zu subretinalen Ödemen, die sehr schnell zur Blindheit führen. wAMD ist durch VEGF-Antikörper behandelbar (Ferrara, 2002).

Auch die diabetische Retinopathie, eine weitere Ursache für Blindheit, geht auf die Wirkung von VEGF zurück. Hier kommt es durch Hypoxie zu lokaler Hochregulation der VEGF-Produktion, dadurch zu erhöhter Permeabilität, Hämorrhagien, Ödemen, vermehrter Gefäßproliferation und Neovaskularisation der Retina und damit verbundenem Verlust des Sehvermögens (Knudsen et al., 2002).

Auch bei Lungenfunktionsstörungen, Hautkrankheiten wie Psoriasis (Schuppenflechte), Arthritis, Nierenerkrankungen und koronaren Herzkrankheiten wird eine Beteiligung von VEGF an der Pathogenese angenommen (Bates, 2010).

1.3. VEGF in der Lunge

1.3.1. Physiologische Funktionen von VEGF in der Lunge

VEGF ist für die Entwicklung der Lunge von großer Bedeutung, ebenso wie für das gesamte Gefäßsystem (Compernelle et al., 2002; Healy et al., 2000). Ein Verlust an VEGF führt zu Emphysembildung, gestörter Septierung der Lunge sowie respiratorischer Insuffizienz und generell einer gestörten Lungenentwicklung (Gerber et al., 1999a; Carmeliet et al., 1999). Die Überexpression von VEGF in peripheren Epithelzellen führt zur Dymorphogenese (Akeson et al., 2003; Akeson et al., 2005). In der adulten Lunge ist es außerdem für die strukturelle Erhaltung wichtig (Voelkel et al., 2002), vor allem durch Kontrolle von Apoptose und Proliferation.

Wie bereits beschrieben ist VEGF außerdem ein potenter Überlebensfaktor für Endothel- und auch Epithelzellen und relevant für die Differenzierung und Proliferation der Zellen (Brown et al., 2001).

In der Lunge befindet sich im alveolären Flüssigkeitsfilm eine 500-fach höhere Konzentration von VEGF als im Plasma (Kaner and Crystal, 2001). Es wird angenommen, dass diese hohen Spiegel für die Funktion und Integrität der alveolären Epithelschicht benötigt wird. Ob dieses VEGF allerdings biologisch aktiv ist, wurde nicht nachgewiesen.

Die Quelle für das alveoläre VEGF sind alveoläre Typ II Pneumozyten und aktivierte Alveolarmakrophagen (Monacci et al., 1993). Dies ist erstaunlich, da Hypoxie einer der wichtigen Faktoren ist, der die VEGF Produktion erhöht und in der Lunge keine hypoxischen Bedingungen herrschen.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Überexpression von VEGF in der Lunge zu einem Lungenödem führt, freies VEGF in der Lunge also genau wie im systemischen Kreislauf eine permeabilitätssteigernde Wirkung hat (Kaner et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Funktion von VEGF in der Lunge bisher nur wenig untersucht wurde und genaue Informationen zur physiologischen Homeostase fehlen.

1.3.2. Pathologische Effekte von VEGF in der Lunge

VEGF wurde bisher schon in vielen Lungenerkrankungen untersucht.

Bei der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD), einer Erkrankung von zu früh geborenen, mechanisch ventilierten Säuglingen werden durch die Hyperoxie VEGF und seine Rezeptoren geringer exprimiert als in gesunden Säuglingen (Bhatt et al., 2001; Lassus et al., 1999). Da VEGF für die Ausbildung einer funktionsfähigen Lunge aber von äußerst großer Bedeutung ist, leiden diese Kinder über Jahre ohne deutliche Verbesserungen an Funktionsstörungen wie limitiertem Luftstrom, Keuchen und Husten (Fakhoury et al., 2010; Filippone et al., 2009). Die Behandlung mit VEGF führte im Tiermodell zu einer Verbesserung der Lungenmorphologie (Thebaud et al., 2005).

In der pulmonalen arteriellen Hypertension (PAH) wurde ebenfalls eine Beteiligung von VEGF angenommen (Tuder et al., 1994). Hohe Expressionslevel von VEGF und Flk-1 wurden in plexiformen Läsionen nachgewiesen. VEGF könnte hier die Proliferation von Endothelzellen und VSMC fördern, was dann zu einer Obliteration des Lumens der Gefäße führt (Hirose et al., 2000). In Tiermodellen gibt es widersprüchliche Ergebnisse über den Effekt von VEGF als Therapeutikum (Lahm et al., 2007). Daher wurde der Schluss gezogen, dass es für die Therapie beim Menschen wahrscheinlich eher nicht in Frage kommt.

Emphysematöse Geschehnisse gehen oft mit verringerter Produktion von VEGF und Flk-1 einher (Kasahara et al., 2001). Da solche pathologischen Veränderungen ebenfalls mit Apoptose von Epithel- und Endothelzellen einhergehen, liegt die Vermutung nahe, dass durch den verringerten Spiegel an VEGF diese Zellen schlecht mit Stimulation fertig werden und dann apoptotisch werden (Kasahara et al., 2000). Apoptotische Zellen führen zu einer positiven Rückkopplung/*feedback*, denn sie setzen inflammatorische Stimuli frei und führen so selbst wiederum zu einer Verschlechterung der Symptomatik (Tuder et al., 2003).

Bei Lungentumoren wird VEGF ebenfalls überexprimiert, hier führt es zu einer Tumor-Angiogenese. Hohe Spiegel von VEGF im Serum korrelieren hier mit einer schlechten Prognose (Kaya et al., 2004; Bando et al., 2004). Anti-VEGF Therapien wurden bei Tumor-Erkrankungen bereits beim Menschen getestet, mehrere Medikamente sind hierzu erhältlich.

Im Asthma wurden bei Patienten ebenfalls erhöhte VEGF Werte im Sputum gemessen (Asai et al., 2003). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass VEGF zur Hyperreaktivität der Atemwege beiträgt (Lee et al., 2002), bei Patienten gibt es ebenfalls Hinweise auf einen Beitrag zum Geschehen (Kanazawa et al., 2002). VEGF reguliert die Chemotaxis

von eosinophilen Granulozyten und ist außerdem für die Sensibilisierung von T-Helferzellen durch Antigene von Bedeutung (Asai et al., 2003; Lee et al., 2004). Die Regulation von VEGF könnte also auch bei asthmatischen Patienten therapeutisch relevant sein.

1.3.3. VEGF im ARDS

Im ARDS ist eines der Hauptmerkmale die Zerstörung der alveolo-kapillären Membran und dadurch die Akkumulation von Ödemflüssigkeit im Alveolarraum. Dies legt die Vermutung nahe, dass VEGF als potenter Permeabilitätsfaktor hier eine Rolle spielen könnte. Tatsächlich weisen Patienten mit ARDS deutlich erhöhte Plasma-Spiegel von VEGF auf (Thickett et al., 2001). Allerdings sind die alveolären VEGF Spiegel in den frühen Stadien von ARDS reduziert, was mit einer vermehrten Apoptose von Endothelzellen assoziiert ist (Abadie et al., 2005; Maitre et al., 2001). Der sFlt-1, der freies VEGF bindet und so seine biologische Aktivität unterbindet, ist im ARDS deutlich vermehrt vorhanden (Perkins et al., 2005), was die permeabilitäts-induzierende Wirkung von VEGF verringert. Im Maus-Modell des LPS-induzierten ARDS wurden sowohl erhöhte Protein-Level von VEGF als auch vermehrte mRNA Expression in der Lunge gezeigt (Karpaliotis et al., 2002). In einem Modell mit Instillation von *Pseudomonas aeruginosa* in Rattenlungen wurden dagegen in der initialen Phase des ARDS verringerte VEGF-Werte gemessen (Maitre et al., 2001).

Bei Patienten, die das ARDS überlebten, war die VEGF Protein-Konzentration im alveolären Flüssigkeitsfilm deutlich höher als bei Patienten, die im Verlauf der Krankheit starben (Koh et al., 2008). Ebenso hatte ein erhöhter VEGF-Spiegel in der Lunge eine protektive Wirkung bei Mäusen, die Hyperoxie ausgesetzt wurden (Corne et al., 2000). Daher liegt die Vermutung nahe, dass VEGF unterschiedliche Effekte im Zeitverlauf des ARDS hat und daher stark reguliert wird. Vermutlich wird zu Beginn des ARDS VEGF herunter reguliert, um einem Fluten der Alveolen mit Ödemflüssigkeit entgegenzuwirken, zu späteren Zeitpunkten scheint eine vermehrte Produktion von VEGF eine positive Wirkung auf die Reparationsvorgänge in der Lunge zu haben, wahrscheinlich durch Unterstützung der Angiogenese und Proliferation von Epithel- und Endothelzellen zur Wiederherstellung der alveolo-kapillären Barriere.

1.4. Fragestellung

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Zusammenhänge beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem Einfluss von VEGF im Tiermodell der LPS-induzierten respiratorischen Insuffizienz.

Folgende Fragestellungen sollen hierbei untersucht werden:

- 1) In wie weit wird VEGF im ARDS reguliert? Welche Zellen sind für die Regulation zuständig?

- 2) Kann man durch therapeutische Gabe von VEGF die respiratorische Insuffizienz positiv beeinflussen?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Materialien für die Tierhaltung

Altromin 1324, Haltungsdiaät - Ratten und Mäuse	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage- Lippe, Deutschland
Altromin Tiereinstreu-Granulat	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage- Lippe, Deutschland
BALB/c-Mäuse	Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland
Käfige Makrolon, Typ II L	Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland

2.1.2. Geräte

Cellspin I, Tharmac	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Dialux Mikroskop	Olympus, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland
Einbettapparat Leica EG1140H	Leica, Wetzlar, Deutschland
ELISA-Reader ELx808	BIO-TEK Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
Entwässerungsautomat Leica ASP300S	Leica, Wetzlar, Deutschland
FACSCalibur two lasers	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Kryostat Leica CM1850 UV	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kühlplatte Leica EG1150C	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lasermikrodissection Leica LMD6500	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Leica DFC310FX	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Leica RM2165	Leica, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop (ND-1000); Neubauer Zählkammer	Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland Labor Optik, Friedrichsdorf, Deutschland

Pinzetten	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Realtime PCR-Cycler	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Stratagene MX 3000P	
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Stereolupe Leica MS 5	Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland
Sysmex KX-21	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland
Thermocycler Biometra T Personal	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermolux® - Wärmeunterlagen	Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland
Waage EMB 1000-2	Kern, Balingen, , Deutschland
Wärmeschrank Memmert	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Micro 22	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.3. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Agarose	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Antisedan® ad us. vet., Injektionslösung (Atipamezol)	Orion Corporation, Espoo, Finnland
BD Mikro-Fine (Spritze), 30G x 8 mm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Collagenase from <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cryomold Standard	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Domitor® ad us. vet., Injektionslösung (Medetomidin)	Orion Corporation, Espoo, Finnland

DPBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Edisonite	Merz, Frankfurt, Deutschland
Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Ethanol (reinst) für die Molekularbiologie	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol 70 %, 96 % und 99,6 %;	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland
fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Hämalaun nach Mayer	Waldeck GmbH & Co, Münster, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 IE/5 ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Hyaluronidase from bovine testes	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 % Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketamin 10% 100 mg/ml, Injektionslösung	belapharm GmbH & Co.KG, Vechta, Deutschland
Lipopolysaccharid von E.coli (Serotyp O111:B4)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Microlance™ Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Recombinant Mouse VEGF 164	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota
Serologische Pipetten 5, 10, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Shandon Eosin Y	Thermo Scientific, München, Deutschland
Sterilfilterspitzen	Nerbe plus GmbH, Wiesen/Luhe, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Linde Gas, Mainz-Kostheim, Deutschland
SYBR® Safe	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Xylazin 2 % 1 ml/20 mg, Injektionslösung	CEVA TIERGESUNDHEIT GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Zitronensäure (Na ₃ Citrat);	Merck, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.3.1. Puffer ELISA

Waschpuffer

1000 ml	Aqua dest	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
2,4 g	TRIS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
0,5 ml	Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaureate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
pH: 7,3		

Blockpuffer

100 ml	PBS	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
1 g	Bovine Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
5 g	Saccharose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
0,05 g	NaN ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland

Diluent

200 ml	Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
0,2 g	BSA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
0,1 ml	Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
0,48 g	TRIS Base	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
1,75 g	NaCl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
pH: 7,3		

2.1.3.2. Puffer FACS

Antibody staining buffer

500 ml	PBS	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
5 g	BSA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
0,5 g	Natrium Azide (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Lysepuffer (10x)

125 ml	A.dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
10,03 g	Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
1,05 g	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
0,465 g	Titriplex (Disodium EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.4. Antikörper

Anti-Mouse CD11b APC	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Anti-Mouse CD45.2 PE	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Anti-Mouse Ly6G (Gr-1) Purified	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
FITC Rat Anti-Mouse Ly-6G and Ly-6C	BD Pharmingen, San Jose, Kalifornien

2.1.5. Verwendete Kits und Assays

BioRad DC Protein Assay	BioRad, Bad Nauheim, Deutschland
iScript cDNA Synthese Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
MIP-2 Duo-Set	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Platinum®SYBR®Green qPCR	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SuperMix UDG	
Quantikine VEGF Immunoassay	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
RNeasy®Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TNF-α Duo-Set	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
VEGF Duo Set	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Mäuse

2.2.1.1. Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden männliche Inzucht Mäuse der Linie BALB/c verwendet, die von Charles River, Sulzfeld, Deutschland geliefert wurden.

Die Haltung der Tiere erfolgte entsprechend tierschutzgerechter Haltung in transparenten Polycarbonatkäfigen unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen. Die Tiere wurden in Gruppen gehalten und wöchentlich umgesetzt. Die Haltung erfolgte bei einer Raumtemperatur von 20 – 22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

Die Mäuse wurden mit einem Gewicht von 22-28 g in die Experimente eingesetzt.

2.2.1.2. Anästhesie

Für die Instillation von LPS bzw. VEGFA wurde eine Injektionsnarkose durchgeführt. Hierfür wurde den Mäusen 0,25 ml/kg KG Domitor (Medetomidin) subcutan injiziert, die Narkose wurde nach Beendigung des Eingriffs mit 0,25 ml/kg KG Antisendan (Atipamezol) antagonisiert.

Für die Anästhesie zur Lungenentnahme für die Lungeneinbettung wurde den Tieren ein Gemisch aus 30 mg Xylazinhydrochlorid / 400 mg Ketaminhydrochlorid pro kg KG mit 1000 I.E. Heparin pro Tier intraperitoneal injiziert.

Für die intraperitoneale Implantation der Transponder wurde eine Injektionsnarkose mit 6 mg Xylazinhydrochlorid / 80 mg Ketaminhydrochlorid pro kg KG intraperitoneal injiziert.

Die Maus wurde fixiert, ventral paramedian abdominal eingestochen und ein Gesamtvolumen von 70-100 µl injiziert.

2.2.1.3. Instillation von LPS bzw. VEGFA in die Trachea

Um die Inflammation der Lunge auszulösen wurde Endotoxin in Form von Lipopolysaccharid (LPS) von E. coli in die Lunge eingegeben. Es wurde eine Menge von 10

µg pro Tier gewählt. Zur Behandlung der Entzündung wurde VEGFA in zwei Konzentrationen 24 h nach LPS-Stimulation in die Lunge instilliert.

Für die intratracheale Instillation wurde die Maus anästhesiert. Sie wurde an den oberen Schneidezähnen auf ein Gestell gehängt, so dass der Eingang in die Trachea gut mit Hilfe eines Mikroskops dargestellt werden konnte. Dann wurde eine Edelstahl-Knopfkanüle (Größe 0.4) durch die Stimmritze in die Trachea eingeführt und eine Lösung von 10 µg LPS in 0,9 %iger NaCl bzw. von 1 ng / 10 ng VEGFA in PBS mit einem Gesamtvolumen von 50 µl langsam in zwei Portionen in die Lunge eingegeben.

Zur Kontrolle des Stimulationserfolges und als Indikator für das Befinden der Mäuse wurden die Tiere bis zur Auswertung täglich gewogen.

2.2.1.4. Applikation des FITC-markierten Ly-6G Antikörpers

Die anästhesierte Maus wurde in Seitenlage gebracht, der Schwanz mit Ethanol desinfiziert und angewärmt. Mit einer Insulinspritze (Mikro Fine, BD) wurde der Maus ein FITC (Fluoreszein) markierter *rat anti-mouse* Antikörper gegen Granulozyten (Ly-6G - *lymphocyte antigen 6 complex, locus G*) intravenös injiziert. Dies führt zu einer Markierung der Granulozyten im Blutkreislauf und im Gefäßbett der Lunge, so dass später durch eine Durchflusszytometrie der Anteil an intravasalen Granulozyten im Lungenhomogenat bestimmt und von interstitiellen Granulozyten differenziert werden kann.

Um eine ausreichende Zirkulation im gesamten Kreislauf zu erreichen wurden die benötigten 5 µg des Antikörpers in 0,9 %iger NaCl verdünnt, ein Gesamtvolumen von 150 µl langsam injiziert und die Maus dann fünf Minuten im Käfig belassen. Erst danach erfolgte die Blutentnahme.

2.2.1.5. Blutentnahme und Bearbeitung

Die anästhesierte Maus wurde auf dem Rücken liegend fixiert und die Abdominalhöhle eröffnet. Nun wurde die V. cava caudalis freigelegt und aus dieser mit einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle (BD Microlance 3, 26G) bis zu 1 ml Blut entnommen. Da diese Menge ca. 40 % des Blutvolumens der Mäuse ausmachte, führte die Blutabnahme zum Tod des Tieres.

Zur weiteren Bearbeitung wurde das Blut in ein EDTA-Hämatologie-Röhrchen umgefüllt und mit einem Sysmex Hämatologie Analysegerät (KX-21) untersucht.

Danach wurden die Blutröhrchen bei 2500 RPM 10 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Plasma wurde für die weitere Verwendung abpipettiert und bei -80 °C tiefgefroren, 200 µl der festen Bestandteile wurden mit 5 ml Lysepuffer für 5 min bei 4 °C im Dunklen (Kühlschrank) inkubiert und die Reaktion dann mit 10-12 ml kaltem PBS abgestoppt.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt, das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert und dann mittels Zentrifugation (*Cellspin*) auf Objektträger aufgebracht um die Leukozyten zu differenzieren.

2.2.1.6. Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Die euthanasierte Maus wurde auf dem Rücken liegend fixiert. Danach wurde ein ca. 2 cm langer Schnitt in der Medianen der ventralen Halsseite vorgenommen und die beiden subkutan liegenden Speicheldrüsen in der Mitte stumpf abpräpariert. Nun wurde noch der M. trachealis durchtrennt, der die Trachea bedeckt. Ein Katheter (Vasocan Braunüle, 20G) wurde zwischen zwei Knorpelspangen in die Trachea eingeführt und eingebunden.

Daraufhin wurde die Lunge mit eiskaltem PBS gespült. Zuerst wurde ein Volumen von 200 µl eingebracht und aspiriert, um die Lunge vorzudehnen. Danach wurde mit ca. 350 µl gespült bis zu einer Gesamtmenge von 1,5 ml. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Lungenflügel gleichmäßig gefüllt und lavagiert wurden.

Die Lavage-Flüssigkeit wurde bei 1200 RPM und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren. Das Pellet wurde in 1 ml *Antibody Staining Buffer* resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die resuspendierten Zellen wurden außerdem wie die Blutzellen mittels *Cellspin* auf Objektträger aufgebracht zur weiteren Differenzierung der Leukozyten.

2.2.1.7. Leukozyten-Zählung

Von den BAL-Zellen und Lungenzellen wurden nach Resuspendieren 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und 4 Großquadrate ausgezählt. Für die Gesamtzellzahl wurde der Durchschnitt zwischen den Werten gebildet, die Gesamtzellzahl dann mittels der folgenden Formel berechnet.

Ausgezählte Zellen (Mittelwert)

1 mm^2 (Fläche eines Großquadrats) x 0,1 mm (Kammertiefe) x 1 (Verdünnungsfaktor)

2.2.1.8. Differenzierung der Leukozyten

Die Leukozyten aus Blut, Lungenhomogenat und BAL wurden mit einer Cellspin-Zentrifuge (5 min, 5000 RPM) auf Objektträger aufgebracht und dann mit einer Pappenheim-Färbung (May-Grünwald/Giemsa) angefärbt. Die Zellen wurden dann unter dem Mikroskop ausgezählt und in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen differenziert um einen prozentualen Überblick über die verschiedenen Leukozyten-Populationen in den verschiedenen Kompartimenten zu erhalten.

2.2.1.9. Lungenentnahme und Bearbeitung

Für FACS/Zelldifferenzierung

Nach dem Tod des Tieres wurde die Lunge mit 10 ml 0,9 %iger NaCl gespült um das Gefäßbett von Blut freizuspülen und danach zur weiteren Analyse entnommen.

Dafür wurde das Gewebe fein zerschnitten, in einen Enzymcocktail aus DNase I (300 U), Hyaluronidase (440 U) und Collagenase XI (480 U) gegeben, der mit 50 µg unmarkiertem Ly-6G Antikörper versetzt wurde, zur Vermeidung unspezifischer Interaktion mit dem zuvor gespritzten markierten Antikörper. Dies wurde dann 30 min bei 37 °C im Thermoschüttler im Dunklen inkubiert.

Das verdaute Homogenat wurde dann durch ein 100 µm *Cell Strainer* (Sieb) gegeben, nochmals durchgedrückt und mit 20 ml PBS nachgespült. Nach Zentrifugation (1200 RPM, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand abgekippt, das Pellet mit 5 ml Lysepuffer resuspendiert, 5 min im Kühlschrank inkubiert und die Reaktion dann mit 20 ml Antibody Staining Buffer abgestoppt.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet mit 1 ml Antibody Staining Buffer resuspendiert und die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer ausgezählt (siehe 2.2.1.7).

Ein Teil der Zellen wurde dann für die FACS-Analyse verwendet, ein anderer Teil mittels Cellspin zur Leukozytendifferenzierung auf Objektträger zentrifugiert.

Für Kryokonservierung

Nach dem Tod des Tieres wurde die Lunge mit 10 ml 0,9 %iger NaCl gespült um das Gefäßbett von Blut freizuspülen und danach der Alveolarraum mit 1,5 ml eiskaltem PBS lavagiert. In die Lunge wurde dann ca. 1-1,5 ml TissueTek® -NaCl (in einer 1:1 Verdünnung) langsam und vorsichtig unter Sichtkontrolle eingegeben (alle Lungenlappen sollten sich gleichmäßig bis in die Spitzen füllen). Daraufhin ligierte man die Trachea um ein Herauslaufen des *OCT-Compounds* zu verhindern und die Lunge wurde aus dem Brustkorb entnommen. Das Präparat wurde in Plastikschrälchen (*Cryomoulds*) gelegt, mit TissueTek® bedeckt und langsam im Stickstoff-Dampf gefroren um Risse zu vermeiden. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

Für Histologie

Nach dem Tod des Tieres wurde die Lunge ebenfalls mit 10 ml 0,9 %iger NaCl gespült. Die Lunge wurde dann durch den Druck einer 20 cm Wassersäule mit 4,5 %igem Formalin vollständig gefüllt, die Trachea ligiert um ein Herauslaufen zu verhindern und dann mit dem Herz zusammen aus dem Brustkorb entnommen. Das Präparat wurde dann in Formalin verbracht und 24 h dort belassen.

Nach der Fixationszeit wurden Herz, Thymusreste, Mediastinum und Trachea entfernt und die Lunge in Einbettkassetten gelegt. Nach dreimaligem Spülen über jeweils 24 h mit PBS wurde das Gewebe mit einem Entwässerungsautomaten entwässert, in Paraffin eingebettet und bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.1.10. Anfertigen von Schnitten

Kryoschnitte

Die in TissueTek® eingebetteten Lungen wurden mit einem Leica Kryostat geschnitten. Von der dorsalen Lungenfläche her wurden Schnitte mit 8 µm Dicke hergestellt. Die PEN-Membran-Objektträger wurden mit Schnitten bedeckt.

Die fertigen Schnitte wurden dann 30 s in Hämalaun gefärbt, zweimal mit Wasser gewaschen und dann nach aufsteigender Alkoholreihe (2 x 70 %, 2 x 96 %, 2 x 99,6 % Ethanol) in 99,6 %igem Ethanol bis zur Mikrodissektion belassen. Eine Lagerung der Gefrierschnitte erfolgte nicht.

Paraffinschnitte

Für die histologische Auswertung der Proben wurden Schnitte aus formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Mauslungen mit einem Mikrotom angefertigt.

Hier wurden ebenfalls von der dorsalen Lungenseite her Schnitte mit 3 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Diese wurden dann über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet und bei Raumtemperatur bis zur Färbung gelagert.

2.2.2. In-vitro Methoden

2.2.2.1. Laser-unterstützte Mikrodissektion (LMD)

Für die LMD wurden Kryoschnitte von Mauslungen auf PEN-Membran-Objektträgern verwendet, um die Gen-Expression speziell in den präkapillären pulmonalen Arteriolen sowie in den alveolaren Septen zu untersuchen.

Es wurden intrapulmonale Arterien mit einem Durchmesser von < 70 µm aufgesucht, unter optischer Kontrolle mit einem Laser (Leica LMD6000) ausgeschnitten und in RNA-Lyse Puffer (RLT-Puffer) mittels Gravitation gesammelt. Pro Lunge wurden 40 Gefäße mikrodisseziert.

Für die Dissektion der Alveolarsepten wurden Bereiche ohne Gefäße und Bronchien aufgesucht und dort 60 Septen disseziert, die ebenfalls in RLT-Puffer aufgefangen wurden.

2.2.2.2. RNA Isolation

RNA aus lasermikrodissezierten Gefäßen und Alveolarsepten wurde mit dem RNeasy®Micro Kit isoliert. Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde außerdem ein DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt.

Die RNA-Konzentrationen der Proben konnte aufgrund der geringen Menge an Ausgangsmaterial nicht gemessen werden, bei Bedarf wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3. cDNA Synthese und *Real-Time* PCR

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des iScript cDNA Synthese Kits durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Ansatz der Reaktion siehe Tabelle 1.

Folgende Reaktionsbedingungen wurden für die cDNA-Synthese im Thermocycler gewählt:

5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C und 5 min bei 85 °C.

Tabelle 1 Reaktionsgemisch cDNA Synthese

5x iScript reaction mix	4 µl
iScript reverse transcriptase	1 µl
H ₂ O (Nuclease frei)	5 µl
RNA (<i>template</i>)	10 µl
Gesamt	20 µl

Zur Untersuchung der relativen mRNA-Mengen wurde anschließend eine *Real-Time* PCR durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in dem Stratagene MX3000P Cycler, die Auswertung mittels des Programmes MXPro 3.00.

Für die PCR-Reaktionen wurde der Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix UDG nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Ansätze wurden wie in Tabelle 2 aufgeführt pipettiert.

Tabelle 2 Reaktionsgemisch *Realtime*-PCR

Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix	13 µl
H ₂ O (Nuclease frei)	9 µl
50 mM MgCl ₂	1 µl
<i>forward</i> Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
<i>reverse</i> Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
cDNA (<i>template</i>)	1 µl
Gesamt	25 µl

Als Negativkontrolle wurde pro amplifiziertes Gen eine *non-template* Kontrolle (Mastermix ohne Zugabe von cDNA) angesetzt.

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

2 min bei 50 °C, 2 min bei 95 °C [10 s bei 95 °C, 20 s bei 60 °C, 10 s bei 72 °C] x 40 Zyklen.

Da SYBR®Green I unselektiv mit doppelsträngiger DNA interkaliert und nur bei Bindung ein Signal gibt wurde die Spezifität der Reaktion durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Dabei wird die Temperatur schrittweise erhöht und die Signalstärke bestimmt, so

kann die Länge der amplifizierten Fragmente bestimmt werden. Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurde außerdem das PCR Produkt mittels einer Gelelektrophorese im 1,5 %igen Agarose-Gel aufgetrennt und visualisiert.

Die ΔC_t Werte für jedes Ziel-Gen wurden wie folgt berechnet:

$$\Delta C_t = C_t \text{ Mittelwert Referenzgen} - C_t \text{ Zielgen}$$

Die Primer (angegeben von 5' nach 3') für die *Real-Time* PCR wurden Intron-überspannend konstruiert und bei Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bestellt.

Tabelle 3 Sequenzen Referenzgene

Gen	Primernamen	Sequenz
Ribosomal Protein L32, Mouse	RPL32_Mus_for	gtt caa ggg cca gat cct ga
	RPL32_Mus_rev	gcg ttg gga ttg gtg act ct
Guanine Nucleotide Binding protein beta polypeptide 2-like 1	GNB2L1_Mus_for	aac aca gat cgc cac cac ac
	GNB2L1_Mus_rev	cga gag ggc aaa ctg acc at
Von-Willebrand-Faktor	vWF_Mus_for	cagcatctctgtggctctga
	vWF_Mus_rev	gatgtgtgtggcaagtgg
Surfactant Protein C	SPC_Mus_for	cagctccaggaacctactgc
	SPC_Mus_rev	cacagcaaggcctaggaag

Tabelle 4 Sequenzen Zielgene

Gen	Primernamen	Sequenz
VEGFA	VEGFA_Mus_for	caggctgctgtaacgatgaa
	VEGFA_Mus_rev	tttgaccctttcccttctct
Flt-1	Flt1_Mus_for	tgaggagctttcaccgaact
	Flt1_Mus_rev	agctggagaagcagaagctg
Flk-1	Flk1_Mus_for	ggcgggtggtgacagtatctt
	Flk1_Mus_rev	gtcactgacagaggcgatga

2.2.2.4. ELISA (TNF- α , MIP-2 und VEGF)

Die ELISA-Platten wurden mit dem *Capture-Antibody* (Erst-Antikörper), der mit 1x PBS verdünnt wurde, beschichtet und bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Je nach Test wurde entweder *goat anti-mouse* TNF- α , *rat anti-mouse* MIP-2 oder *goat anti-mouse* VEGF eingesetzt.

Die vorbeschichteten Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen und unspezifische Bindungsstellen eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer geblockt. Eine Standard-Verdünnungsreihe wurde für den jeweiligen ELISA angesetzt, als Lösungsmittel wurde Diluent verwendet. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Blockpuffer wurde dieser durch Waschen entfernt und Standardreihe sowie Proben (BAL oder EDTA-Blutplasma) in die einzelnen Wells pipettiert.

Die Platten wurden bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert um eine Bindung des Antigens an die auf der Platte gebundenen Antikörper zu erreichen. Ungebundenes Antigen wurde durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt.

Nach Zugabe des biotinmarkierten *Detection-Antibody* (Zweit-Antikörper) auf die Platte (*biotinylated goat anti-mouse* TNF- α , *biotinylated goat anti-mouse* MIP-2 oder *biotinylated goat anti-mouse* VEGF) wurden die Platten erneut zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert um eine Bindung des Zweit-Antikörpers an das gebundene Antigen zu erreichen. Ungebundener Zweit-Antikörper wurde durch Waschen entfernt.

Danach erfolgte eine 20 minütige Zugabe von enzymkonjugiertem Streptavidin.

Dieses Protein ist aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut, jede der vier Untereinheiten kann mit sehr hoher Affinität ein Biotinmolekül binden. Die Streptavidin-Biotin-Bindung ist eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen, unspezifische Bindungen sind äußerst selten. Eine Untereinheit bindet an Biotin, die anderen Untereinheiten sind durch biotin-gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) abgesättigt.

Nach erneutem Waschen wurde das Substrat für die HRP, Tetramethylbenzidine (TMB) zugegeben und die Farbreaktion nach 20 minütiger Inkubation im Dunklen durch 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Messung der Intensität der Farbreaktion wurde mittels eines ELISA-Readers bei 450 nm vorgenommen.

2.2.2.5. Proteinbestimmung in der BAL

Der Proteingehalt in der BAL wurde nach BIORAD-Protokoll bestimmt. Als Standard diente Bovines Serumalbumin (BSA) in einer Verdünnungsreihe. 5 µl Probenvolumen wurden in ein Well vorgelegt, dann wurden zunächst 25 µl Lösung A und schließlich 200 µl Reagenz B zu jeder Probe und zu jedem Standard hinzupipettiert um den gewünschten Farbumschlag zu erhalten. Die so pipettierte Mikrotiterplatte wurde abgedunkelt und für drei Minuten gerüttelt.

Danach wurde die Probe mit einem ELISA-Reader bei 550 nm photometrisch gemessen.

2.2.2.6. Histologie

Zur Beurteilung der Lungenmorphologie und der pathologischen Veränderungen wurden Hämatoxilin-Eosin-Färbungen der Lungenschnitte hergestellt.

Durch Hämatoxilin werden saure Moleküle dargestellt, sodass die Kerne, aber auch andere saure Substanzen, Bakterien und Kalk blau erscheinen. Das Zytoplasma der Zellen, Kollagen und proteinhaltige Lösungen werden durch Eosin rosa bis rot angefärbt. Die Paraffinschnitte wurden zuerst zehn Minuten mit Xylol vorbehandelt um das Paraffin zu entfernen und dann in absteigender Alkoholreihe (99,6 %, 96 %, 70 %) rehydriert.

Nach einer 20minütigen Färbung in Haemalaun wurden die Schnitte für fünf Minuten in Leitungswasser gewaschen und mit Eosin für 4 Minuten gegengefärbt. Nach Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (96 %, 99,6 %, 99,6 %) dehydriert, mit Xylol dreimal geklärt und mit Pertex® als Eindeckelmedium und einem Deckglas versehen. Die fertigen Schnitte wurden in lichtundurchlässigen Präparatekästen gelagert und mittels eines Lichtmikroskops ausgewertet.

2.2.2.7. Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence activated cell sorting)

Zur Bestimmung der prozentualen Anteile von intravasalen sowie interstitiellen Leukozyten im Lungenhomogenat wurde den Tieren fünf Minuten vor der Euthanasie der FITC markierte Antikörper gegen Granulozyten (siehe 2.2.1.4) intravenös injiziert. Die Antikörper konnten so mehrmals durch den gesamten Kreislauf zirkulieren und intravasal befindliche Granulozyten markieren. Nach dem Tod des Tieres wurden die Lungengefäße mit

physiologischer NaCl gespült, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen, die Lunge daraufhin entnommen und bearbeitet (siehe 2.2.1.9). Von den gewonnenen Zellen wurden dann 500 000 in ein Röhrchen überführt, die dann mit einem APC-markierten (Allophycocyanin) Antikörper gegen CD11b (Integrin, das auf Granulozyten und Monozyten exprimiert wird) sowie mit einem PE-markierten (Phycoerythrin) Antikörper gegen CD45.2 (Tyrosinkinase, die auf allen Leukozyten exprimiert wird) gegengefärbt und dann mittels FACS analysiert.

Bei der FACS Analyse werden Zellen in einem Hüllstrom fokussiert und passieren dann einzeln einen Laser-Strahl. Je nach Größe und Granularität wird das Signal von den Zellen gestreut, dies wird dann für die Größe als Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) oder für die Granularität als Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) von Detektoren wahrgenommen, das Signal amplifiziert und dann an einen Computer übertragen. Zellen, die mittels fluoreszierender Antikörper markiert wurden, geben außerdem ein für den jeweiligen Farbstoff spezifisches Signal ab, wenn sie mit einer bestimmten Wellenlänge stimuliert werden, was mittels spezifischer Fluoreszenzkanäle gemessen werden kann. Im verwendeten Gerät waren zwei Laser unterschiedlicher Wellenlängen verbaut, daher war eine Messung mehrerer Farbstoffe problemlos möglich.

Die Zellen wurden zuerst aufgrund ihrer Größe und Granularität untersucht und die Fraktion der Granulozyten weiter untersucht. Danach wurde der Anteil der CD45.2 positiven Zellen bestimmt und nur die positiven Zellen zur weiteren Bestimmung ausgewählt. Von diesen Zellen wurde die Markierung mit dem CD11b sowie dem Ly-6G Antikörper gemessen. Alle Granulozyten sollten mit dem CD11b-Antikörper markiert sein, die intravaskulären Granulozyten wiesen außerdem ein Signal für den FITC-Ly-6G auf. Daher war eine Trennung von intravasalen und interstitiellen Granulozyten möglich. Die Software des Programms kalkulierte genaue Prozentangaben aufgrund der gemessenen Zellzahl in der Probe.

2.3. Protokoll der Experimente

2.3.1. Gruppeneinteilung

Tiere für die Lungenentnahme zur Mikrodissektion

1. Gruppe: Tiere ohne LPS
2. Gruppe: Tiere mit LPS, Zeitpunkt der Euthanasie 4 h nach LPS
3. Gruppe: Tiere mit LPS, Zeitpunkt der Euthanasie 24 h nach LPS

- 4. Gruppe: Tiere mit LPS, Zeitpunkt der Euthanasie 48 h nach LPS
- 5. Gruppe: Tiere mit LPS, Zeitpunkt der Euthanasie 72 h nach LPS

Tiere für die Lungenentnahme zur Paraffineinbettung

Subgruppe 10 µg LPS

- 1. Gruppe: Unbehandelte Tiere
- 2. Gruppe: Tiere mit LPS, Euthanasie 24 h nach LPS
- 3. Gruppe: Tiere mit LPS, Euthanasie 48 h nach LPS
- 4. Gruppe: Tiere mit LPS, Euthanasie 72 h nach LPS
- 5. Gruppe: Tiere mit LPS, Euthanasie 120 h nach LPS

Subgruppe 10 µg LPS und 1 ng VEGFA

- 6. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 1 ng VEGFA, Euthanasie 48 h nach LPS
- 7. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 1 ng VEGFA, Euthanasie 72 h nach LPS
- 8. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 1 ng VEGFA, Euthanasie 120 h nach LPS

Subgruppe 10 µg LPS und 10ng VEGFA

- 9. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 10 ng VEGFA, Euthanasie 48 h nach LPS
- 10. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 10 ng VEGFA, Euthanasie 72 h nach LPS
- 11. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 10 ng VEGFA, Euthanasie 120 h nach LPS

Tiere für die BAL und FACS-Auswertung

Subgruppe 10 µg LPS

- 1. Gruppe: Unbehandelte Tiere
- 2. Gruppe: Tiere mit LPS, Euthanasie 24 h nach LPS
- 3. Gruppe: Tiere mit LPS, Euthanasie 48 h nach LPS
- 4. Gruppe: Tiere mit LPS, Euthanasie 72 h nach LPS
- 5. Gruppe: Tiere mit LPS, Euthanasie 120 h nach LPS

Subgruppe 10 µg LPS und 1 ng VEGFA

- 6. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 1 ng VEGFA, Euthanasie 48 h nach LPS
- 7. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 1 ng VEGFA, Euthanasie 72 h nach LPS

8. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 1 ng VEGFA, Euthanasie 120 h nach LPS

Subgruppe 10 µg LPS und 10ng VEGFA

9. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 10 ng VEGFA, Euthanasie 48 h nach LPS

10. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 10 ng VEGFA, Euthanasie 72 h nach LPS

11. Gruppe: Tiere mit LPS, Behandlung mit 10 ng VEGFA, Euthanasie 120 h nach LPS

2.3.2. Zeitverlauf

Die Tiere wurden am Tag 0 mit 10 µg LPS intratracheal stimuliert, die Kontroll-Gruppe erhielt keine Instillation. 24 h später wurden die Subgruppen mit 1 ng bzw. 10 ng VEGFA intratracheal behandelt, die LPS-Subgruppe erhielt keine weitere Behandlung.

Das Versuchsende erfolgte in der LPS-Gruppe 24, 48, 72 und 120 h nach LPS-Instillation.

In den VEGF-Gruppen erfolgte das Versuchsende 48, 72 und 120 h nach LPS-Gabe.

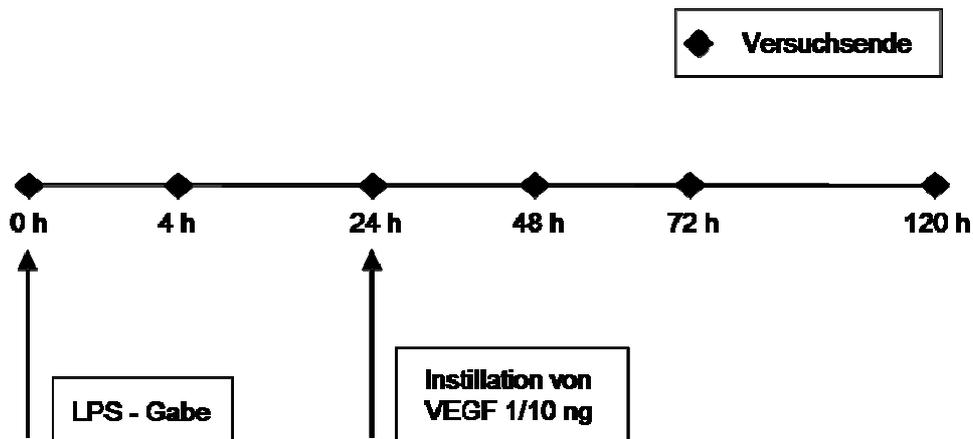


Abbildung 5 Versuchsablauf

2.4. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden bei den Tiergruppen die Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Mittelwerte berechnet.

Für die Analyse der realtime-PCR-Daten wurde eine einfaktorische ANOVA (analysis of variance, Varianzanalyse) angewandt. Als post-hoc Test wurden alle Daten nach Bonferroni-Korrektur verglichen.

Eine zweifaktorielle ANOVA wurde verwendet, um die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten und den Tiergruppen zu bestimmen. Als post-hoc Test wurden alle Daten nach Bonferroni-Korrektur verglichen.

Die Box und Whisker Plots (Abbildung 6 - Abbildung 11) zeigen in der Box die mittleren 50 % der Daten, wobei der Mittelstrich den Mittelwert angibt. Die Whisker zeigen die maximalen und minimalen gemessenen Werte.

Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die Analysen erfolgten durch das Programm GraphPad Prism 5.0.

3. Ergebnisse

3.1. Tierzahlen

In die Arbeit fließen die Daten von 152 Mäusen ein. Diese Tiere waren alle BALB/c Wildtyp-Mäuse. Für die Einbettung der Lungen zur PCR-Analyse wurden 20 Tiere verwendet. Für die Therapie-Gruppen wurden je 36 Tiere mit 1 ng bzw. 10 ng VEGF behandelt und wiederum 60 Tiere dienten als Kontrollen.

3.1.1. Allgemeine Entzündungsanzeichen

Die Tiere wurden mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) aus *E. coli* intratracheal stimuliert. Zur Evaluierung des Stimulationserfolges wurden sie nach der Narkose überwacht und zeigten einen Tag nach dem Eingriff deutliche Krankheitsanzeichen, wie gesträubtes Fell, verringerte Aktivität und generell ein gestörtes Allgemeinbefinden. Die Tiere wurden täglich gewogen, um einen objektiven Parameter zur Bestimmung des Stimulationserfolges zu haben.

Die Tiere nahmen alle nach LPS-Eingabe ab, durchschnittlich 9 % des Ausgangsgewichtes innerhalb der ersten 24 Stunden. Die Tiere, die kein LPS erhielten, verloren kein Gewicht. Nach fünf Tagen hatten alle Tiere ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht.

3.1.2. VEGF mRNA-Expression im Zeitverlauf

Um die Verhältnisse im Zeitverlauf des LPS-induzierten ALI zu evaluieren, wurden die Lungen von 20 Mäusen lavagiert und in TissueTek® eingebettet, geschnitten und bei diesen Schnitten durch Lasermikrodissektion Endothelzellen von 20-70 µm großen präkapillaren Arteriolen (im Weiteren als Endothel bezeichnet) und alveoläre Septen (im Weiteren als Epithel bezeichnet) ausgeschnitten. Aus diesen Proben wurde die mRNA isoliert, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und dann als *Template* in die *realtime*-PCR eingesetzt. Zur Normalisierung wurden zwei Referenz-Gene eingesetzt, Ribosomales Protein L32 (RPL32) sowie *guanine nucleotide binding protein beta polypeptide 2-like 1* (GNB2L1), die Werte wurden auf die Durchschnittswerte der Referenz-Gene normalisiert. Um die Reinheit der Proben zu verifizieren, wurden die Proben außerdem auf die Expression von Von-Willebrand-Faktor (vWF) für Endothelzellen und Surfactant Protein C (SP-C) für Epithelzellen untersucht. Zur

Bestimmung der Expressionswerte für VEGF und die Rezeptoren Flt-1 sowie Flk-1 wurden ebenfalls spezifische Primer verwendet.

3.1.3. Regulation der mRNA von VEGF und der Rezeptoren im Endothel nach LPS

VEGF wurde in den Endothelzellen bei den Tieren im Zeitverlauf des LPS-induzierten ALI nur geringgradig reguliert. Nur 48 Stunden nach der Instillation war die mRNA signifikant reduziert. Zu allen anderen Zeitpunkten war keine Regulation feststellbar.

Ähnliches zeigt sich bei beiden Rezeptoren, Flt-1 und Flk-1. Diese waren im Zeitverlauf nicht reguliert.

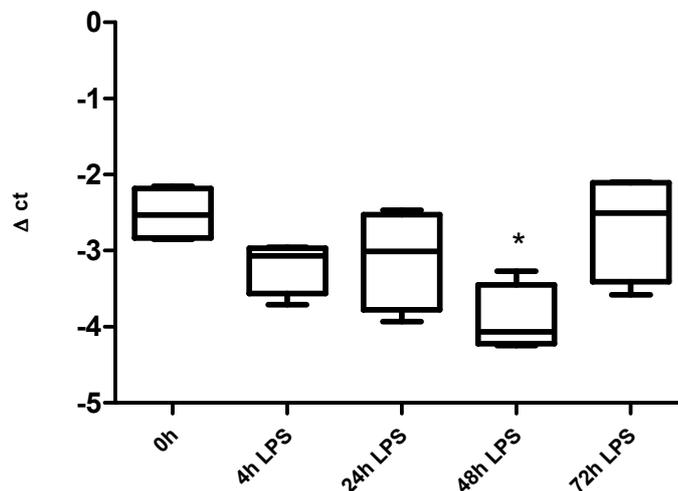


Abbildung 6 VEGF mRNA in Endothelzellen

Dargestellt ist die Veränderung der VEGF-mRNA in mikrodisszezierten Endothelzellen nach Instillation von LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe (0h). Signifikanz (*) $p < 0,05$ im Vergleich mit $t = 0h$, $n = 4$ Tiere mit Doppelbestimmung. Die Box zeigt den Interquartilsabstand an, der Mittelstrich den Median-Wert und die Whisker die minimal und maximal gemessenen Werte.

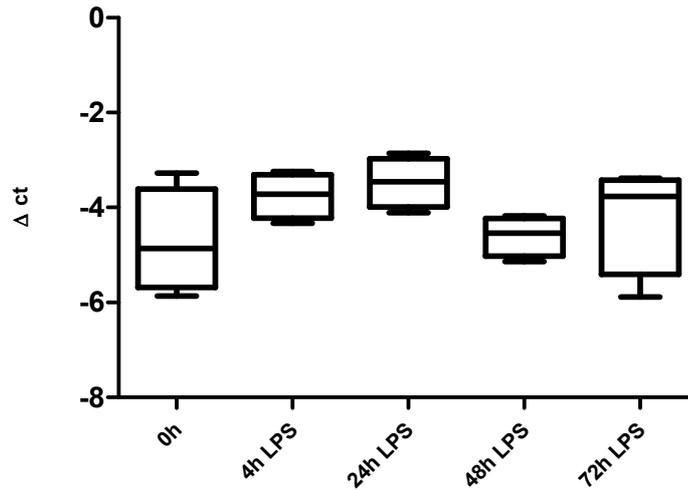


Abbildung 7 Flt-1 mRNA in Endothelzellen

Dargestellt ist die Veränderung der Flt-1-mRNA in mikrodisezierten Endothelzellen nach Instillation von LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe (0h). n = 4 Tiere mit Doppelbestimmung. Die Box zeigt den Interquartilsabstand an, der Mittelstrich den Median-Wert und die Whisker die minimal und maximal gemessenen Werte.

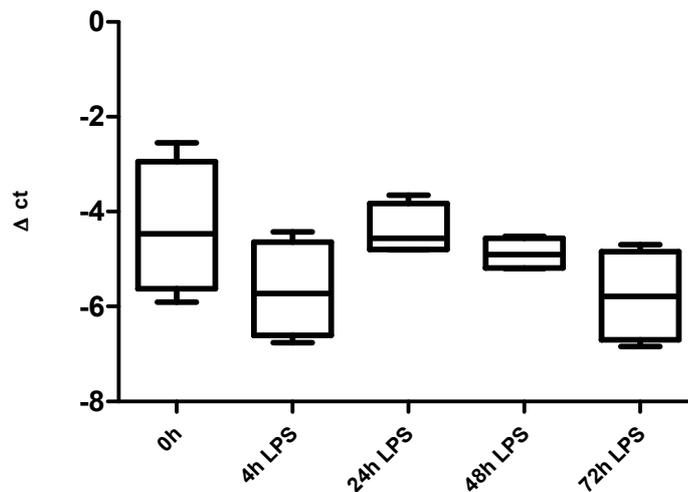


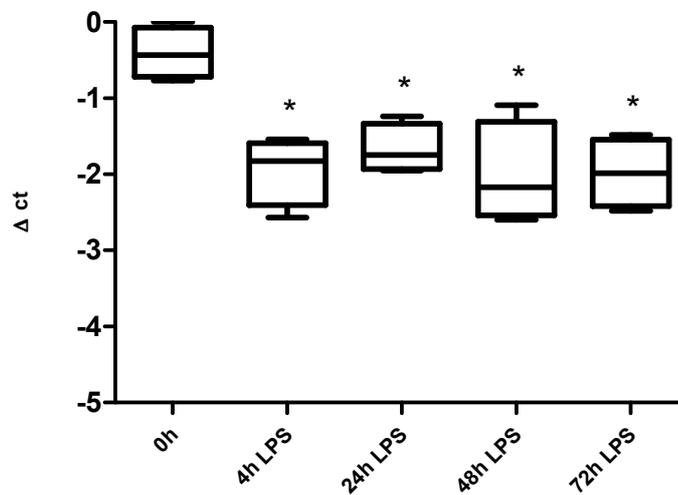
Abbildung 8 Flk-1 mRNA in Endothelzellen

Dargestellt ist die Veränderung der Flk-1-mRNA in mikrodisezierten Endothelzellen nach Instillation von LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe (0h). n = 4 Tiere mit Doppelbestimmung. Die Box zeigt den Interquartilsabstand an, der Mittelstrich den Median-Wert und die Whisker die minimal und maximal gemessenen Werte.

3.1.4. Regulation der mRNA von VEGF und der Rezeptoren im Epithel

nach LPS

Im alveolären Kompartiment war die mRNA von VEGF im Zeitverlauf schnell nach der Stimulation stark herunterreguliert. Es war eine signifikante Verringerung der Expression zu allen Zeitpunkten ersichtlich, die auch nach 72 Stunden fortbestand. Der Flt-1 war, wie schon in den Endothelzellen, zu keinem Zeitpunkt reguliert. Die Expression des Flk-1 war jedoch bereits 4 Stunden nach der Stimulation stark verringert, dies änderte sich bis 72 Stunden nach der LPS-Stimulation nicht.

**Abbildung 9 VEGF mRNA in Epithelzellen**

Dargestellt ist die Veränderung der VEGF-mRNA in mikrodisszierten Epithelzellen nach Instillation von LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe (0h). Signifikanz (*) $p < 0,05$ im Vergleich mit $t = 0h$, $n = 4$ Tiere mit Doppelbestimmung. Die Box zeigt den Interquartilsabstand an, der Mittelstrich den Median-Wert und die Whisker die minimal und maximal gemessenen Werte.

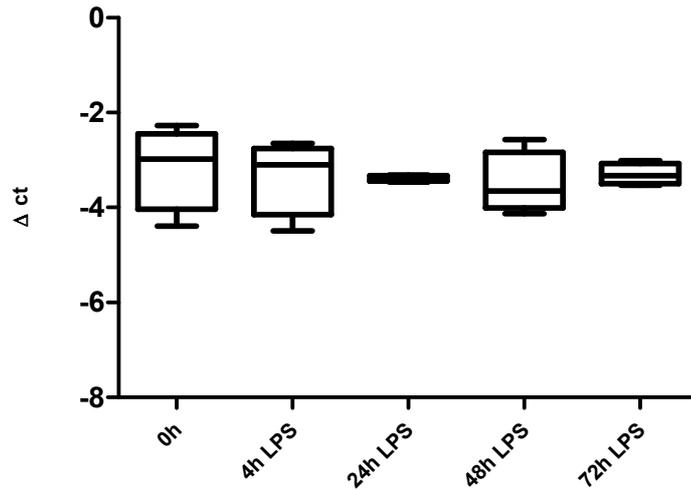


Abbildung 10 Flt-1 mRNA in Epithelzellen

Dargestellt ist die Veränderung der Flt-1-mRNA in mikrodisssezierten Epithelzellen nach Instillation von LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe (0h). $n = 4$ Tiere mit Doppelbestimmung. Die Box zeigt den Interquartilsabstand an, der Mittelstrich den Median-Wert und die Whisker die minimal und maximal gemessenen Werte.

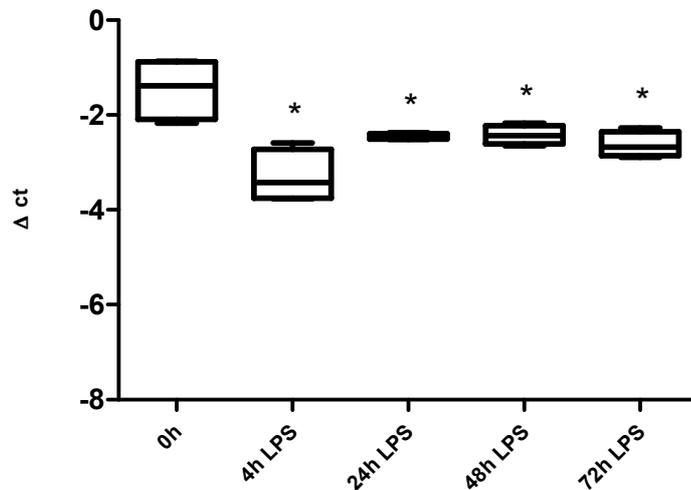


Abbildung 11 Flk-1 mRNA in Epithelzellen

Dargestellt ist die Veränderung der Flk-1-mRNA in mikrodisssezierten Epithelzellen nach Instillation von LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe (0h). Signifikanz (*) $p < 0,05$ im Vergleich mit $t = 0h$, $n = 4$ Tiere mit Doppelbestimmung. Die Box zeigt den Interquartilsabstand an, der Mittelstrich den Median-Wert und die Whisker die minimal und maximal gemessenen Werte.

3.2. Leukozytentransmigration

3.2.1. Transmigration in den Alveolarraum

3.2.1.1. Anzahl der Leukozyten in der BAL

Da ein wichtiges Merkmal der respiratorischen Insuffizienz die Einwanderung von Leukozyten in den Alveolarraum ist; wurde bei den Tieren 24, 48, 72 und 120 Stunden nach der Stimulation eine bronchoalveolärer Lavage durchgeführt und so die in den Alveolarraum eingewanderten Leukozyten gewonnen und ausgezählt.

In der LPS-Kontrollgruppe ergab sich der erwartete Zeitverlauf. Unstimulierte Tiere wiesen nur sehr geringe Leukozytenzahlen in der Lunge auf, $0,1 \pm 0,0 \times 10^6$ Zellen. Ein massiver Anstieg der Leukozyten wurde 24 Stunden nach LPS auf $2,5 \pm 0,4 \times 10^6$ Zellen beobachtet, der bis 48 Stunden nach Stimulation auf $3,9 \pm 0,3 \times 10^6$ Zellen weiter anstieg. Danach fielen die Zellzahlen wieder ab auf $2,3 \pm 0,1 \times 10^6$ Zellen nach 72 Stunden und weiter auf $0,5 \pm 0,1 \times 10^6$ Zellen nach fünf Tagen.

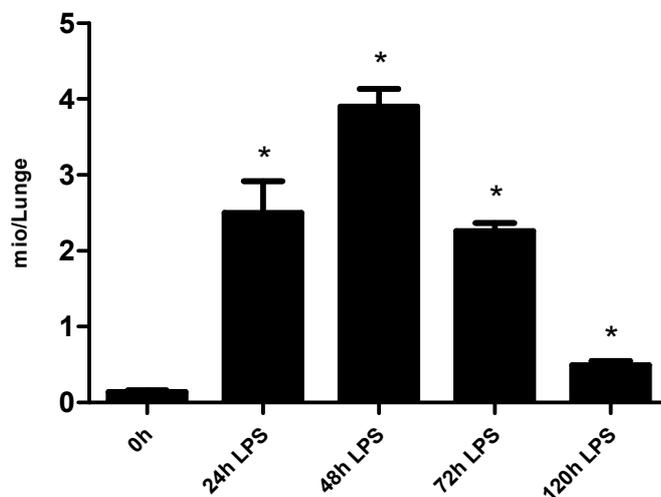


Abbildung 12 Leukozytenanzahl in der BAL nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.

Dargestellt sind die Ergebnisse für Tiere mit LPS-Stimulation ohne weitere Behandlung. Es zeigen sich signifikante Unterschiede im Zeitverlauf. Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit $t = 0h$; dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 6$ Tiere.

Die Tiere, die mit 1 ng VEGF 24 Stunden nach der Stimulation intratracheal behandelt wurden, wiesen 48h nach LPS-Stimulation eine signifikant geringere Zellzahl in der BAL auf, unabhängig von der Menge des instillierten VEGF. Die Gruppe, die mit 1 ng VEGF

behandelt wurde, hatte $2,6 \pm 0,1 \times 10^6$ Zellen in der Lavage, die Gruppe mit 10 ng VEGF $2,7 \pm 0,3 \times 10^6$ Zellen und die Kontrollgruppe mit LPS Stimulation $3,9 \pm 0,3 \times 10^6$ Zellen (s.o.). Zu den späteren Zeitpunkten waren die Unterschiede nicht mehr signifikant. Zum Zeitpunkt 72 h wurden in der 1 ng VEGF Gruppe $1,4 \pm 0,1 \times 10^6$ Zellen und in der 10 ng VEGF Gruppe $1,7 \pm 0,1 \times 10^6$ Zellen gezählt. Dies ist zwar geringer als in der LPS Kontrollgruppe ($2,3 \pm 0,1 \times 10^6$ Zellen) aber nicht signifikant. Fünf Tage nach Stimulation lag die Zellzahl in den Behandlungsgruppen auf gleichem Niveau wie die Kontrollgruppe.

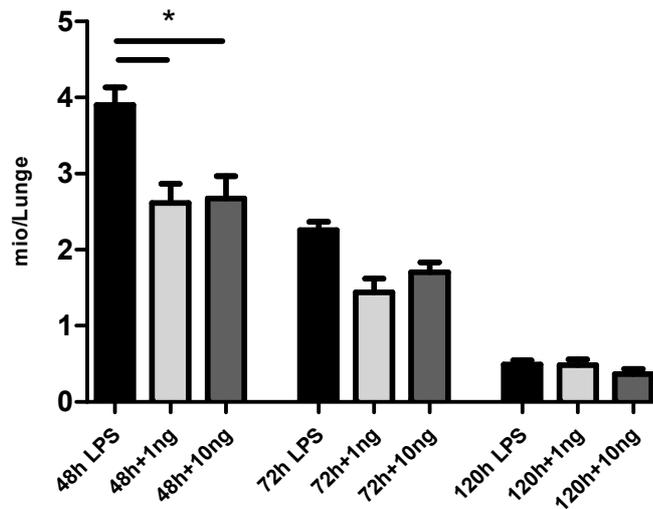


Abbildung 13 Leukozytenanzahl in der BAL nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Tiere mit LPS-Stimulation ohne weitere Behandlung und mit 1 ng bzw. 10 ng VEGF 24 Stunden nach Stimulation. Signifikante Unterschiede zur unbehandelten LPS-Gruppe ergeben sich nur bei 48 h. 72 h und 120 h nach LPS- Instillation sind die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht mehr signifikant. Signifikanz (*) $p < 0,05$ im Vergleich zur LPS-Gruppe; dargestellt sind MW \pm SEM, n = 6 Tiere.

3.2.1.2. Differenzierung der Leukozyten in der BAL

Die Differenzierung der in der Lavage gefundenen Zellen ergab in der unstimulierten Kontroll-Gruppe 90 ± 1 % Monozyten/Makrophagen, 5 ± 1 % Granulozyten und 5 ± 1 % Lymphozyten. Nach Stimulierung mit LPS kam es zu einer Migration von Granulozyten. So setzt sich die Zellpopulation im Alveolarraum 24 h nach LPS aus 6 ± 1 % Monozyten/Makrophagen, 92 ± 1 % Granulozyten und 3 ± 1 % Lymphozyten zusammen. Zwei Tage nach der Stimulation begann der Makrophagen/Monozyten-Anteil zuzunehmen.

Die Verhältnisse sahen nun folgendermaßen aus: 13 ± 2 % Monozyten/Makrophagen, 84 ± 3 % Granulozyten und 3 ± 1 % Lymphozyten. Diese Verschiebung setzte sich im weiteren Verlauf fort, immer mehr Monozyten und Makrophagen wanderten in die Lungen ein. 72 h nach der Stimulation fanden sich nun 31 ± 3 % Monozyten/Makrophagen, 56 ± 4 % Granulozyten und 13 ± 3 % Lymphozyten in der Lunge. Am fünften Tag war das initiale Verhältnis fast wieder hergestellt, es fanden sich noch 79 ± 2 % Monozyten/Makrophagen, 3 ± 1 % Granulozyten und 18 ± 3 % Lymphozyten in der BAL.

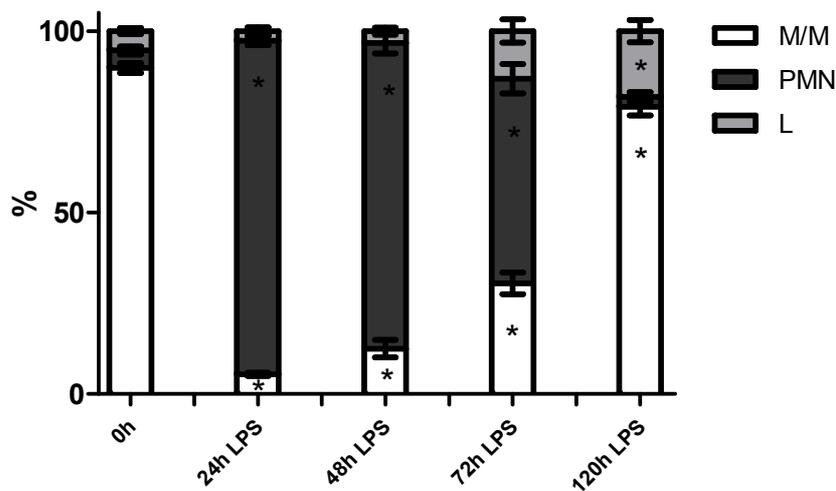


Abbildung 14 Leukozytendifferenzierung in der BAL nach Stimulation mit $10 \mu\text{g}$ LPS i.t.

Differenzierung der Leukozytenpopulation in der BAL im Zeitverlauf nach LPS Stimulation. M/M steht für Monozyten/Makrophagen, PMN für Granulozyten und L für Lymphozyten, Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit $t = 0\text{h}$; dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SEM}$, $n = 6$ Tiere.

Die Tiere, die 24 Stunden nach LPS mit VEGF behandelt wurden, zeigten am nächsten Tag keine Verschiebung in den Leukozytenpopulationen, 72 Stunden nach LPS ergab sich hier jedoch ein anderes Bild. Die Gruppe, die mit 1 ng behandelt wurde hatte einen um 17 % höheren Anteil an mononukleären Zellen (47 ± 5 % Monozyten/Makrophagen) sowie einen um 21 % geringeren Anteil an neutrophilen Granulozyten (35 ± 5 %) in der Lavage als die LPS-Gruppe. Nach Behandlung mit 10 ng war kein großer Unterschied zur LPS-Gruppe feststellbar. Am fünften Tag nach der Stimulation lagen die beiden behandelten Gruppen wieder auf einem ähnlichen Niveau wie die LPS-Gruppe.

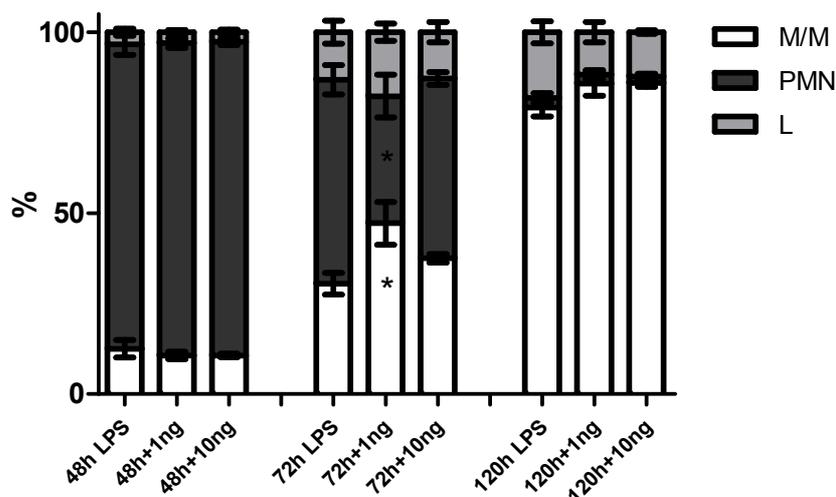


Abbildung 15 Leukozytendifferenzierung in der BAL nach Stimulation mit 10 μ g LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Vergleich der Gruppen 48, 72 und 120 Stunden nach LPS-Stimulation. Behandlung der Tiere 24 Stunden nach LPS-Gabe mit unterschiedlicher VEGF-Menge.

M/M steht für Monozyten/Makrophagen, PMN für Granulozyten und L für Lymphozyten, Signifikanz (*) $p < 0,05$ im Vergleich zur LPS-Gruppe; dargestellt sind MW \pm SEM, $n = 6$ Tiere.

3.2.2. Transmigration in das Lungeninterstitium

3.2.2.1. Anzahl der Leukozyten im Interstitium

Durch einen inflammatorischen Stimulus werden Leukozyten zur Transmigration in das entzündete Gewebe angeregt. Vor der Euthanasie wurde den Mäusen ein Antikörper zur Markierung der intravasalen Granulozytenpopulation gespritzt. Nach der Euthanasie wurde den Tieren die Lunge entnommen, in den Kapillaren befindliches Restblut herausgespült und die Lungen dann mit einem Enzymcocktail verdaut. Die so gewonnenen Zellen wurden gezählt, differenziert und mittels FACS Analyse in interstitielle und adhärenz vaskuläre Granulozyten unterteilt.

In den Lungen von unbehandelten Kontrolltieren befanden sich $14,3 \pm 1,5 \times 10^6$ Zellen. Durch LPS-Stimulation verdoppelte sich dieser Wert auf $31,2 \pm 2,4 \times 10^6$ Zellen innerhalb von 24 Stunden, stieg dann auf $38,8 \pm 2,6 \times 10^6$ Zellen nach 48 Stunden, wo er auch 3 Tage nach der Stimulation blieb. Erst am 5. Tag nach der Instillation sank die Zellzahl in der Lunge wieder auf 30 Millionen Zellen.

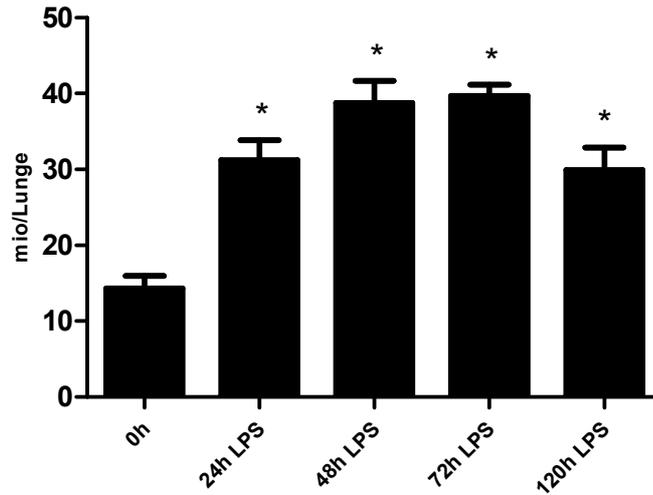


Abbildung 16 Leukozytenanzahl im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.

Dargestellt sind die Zellzahlen von Tieren nach Stimulation mit LPS ohne weitere Behandlung. Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit $t = 0h$; dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 6$ Tiere.

Bei den Tiergruppen, die mit 1 ng bzw. 10 ng VEGF 24 Stunden nach der LPS-Stimulation intratracheal behandelt wurden ergibt sich ein ähnliches Bild. Die Anzahl der Leukozyten ist zwar tendenziell geringer, diese Unterschiede sind aber auf Grund der großen Streuung nicht signifikant.

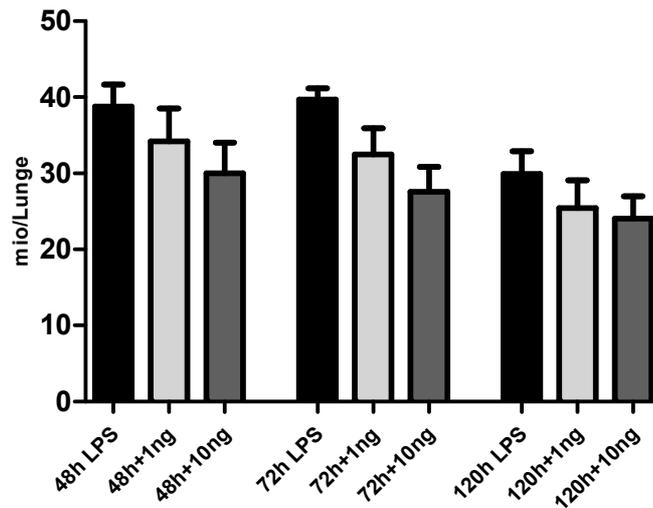


Abbildung 17 Leukozytenanzahl im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Tiere mit VEGF-Behandlung im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe 48, 72 und 120 Stunden nach der LPS Stimulation. Behandlung der Tiere 24 Stunden nach LPS-Gabe. Dargestellt sind MW \pm SEM, n = 4 - 6 Tiere.

3.2.2.2. Differenzierung der Leukozyten im Interstitium

Bei der differenzierten Auszählung der Leukozyten aus dem Lungengewebe ergab sich bei unstimulierten Mäusen ein Anteil von 42 ± 5 % Monozyten/Makrophagen, 17 ± 5 % Granulozyten und 41 ± 5 % Lymphozyten. 24 Stunden nach LPS- Instillation steigt der Anteil der Granulozyten auf 69 ± 3 %, der Anteil von Monozyten/Makrophagen sinkt auf 11 ± 1 %, die Lymphozyten machen dann noch 21 ± 2 % aus. Diese Verschiebung in der Leukozytenverteilung bleibt auch 48 Stunden nach der Stimulation bestehen, erst nach 72 Stunden nimmt der Anteil der Monozyten wieder merklich zu. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich 37 ± 2 % Monozyten und Makrophagen, 29 ± 3 % Granulozyten und 34 ± 3 % Lymphozyten im Lungenhomogenat. Fünf Tage nach Auslösen des ARDS sind die Werte wieder ähnlich zu denen vor der LPS-Gabe.

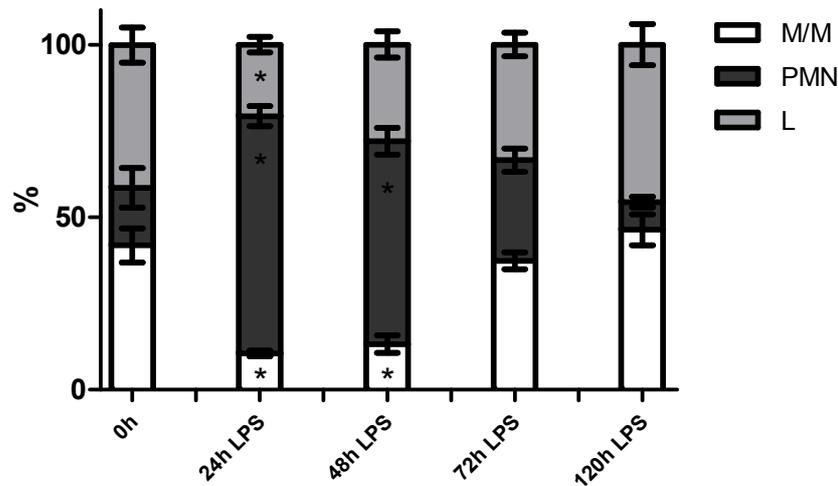


Abbildung 18 Leukozytendifferenzierung im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.

Differenzierung der Leukozytenpopulationen aus dem Lungengewebe zu verschiedenen Zeitpunkten im LPS-induzierten ARDS. M/M steht für Monozyten/Makrophagen, PMN für Granulozyten und L für Lymphozyten, Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit $t = 0h$; dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 5 - 6$ Tiere.

Bei der Differenzierung der Leukozyten im Lungenhomogenat der mit VEGF behandelten Mäuse ergab sich ein ähnliches Bild wie bei der LPS-Gruppe. Nur zum Zeitpunkt 72 Stunden nimmt der Anteil an Granulozyten in beiden Behandlungsgruppen ab, mehr noch bei 10 ng im Vergleich zu 1 ng. Der Unterschied liegt allerdings nicht einmal bei 10 %.

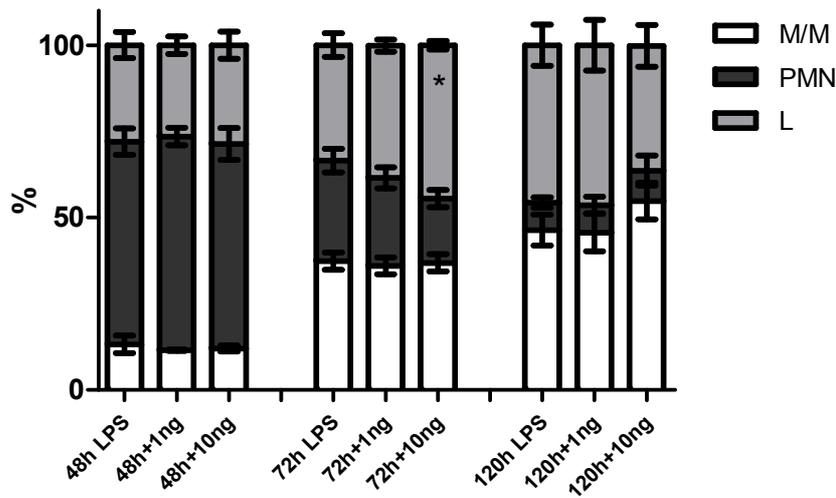


Abbildung 19 Leukozytendifferenzierung im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Tiere mit VEGF-Behandlung im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe 48, 72 und 120 Stunden nach der LPS Stimulation. Behandlung der Tiere 24 Stunden nach LPS-Gabe. M/M steht für Monozyten/Makrophagen, PMN für Granulozyten und L für Lymphozyten, Signifikanz (*) $p < 0,05$ im Vergleich zur LPS-Gruppe; dargestellt sind MW \pm SEM, $n = 5 - 6$ Tiere.

3.2.3. Quantifizierung intravasaler und interstitieller Granulozyten

Durch FACS-Analyse wurde die Granulozyten-Population im Lungenhomogenat in interstitielle Granulozyten und vaskuläre adhärenente Granulozyten unterteilt. Hierfür wurde den Tieren vor der Euthanasie ein markierter Antikörper gegen diesen Zelltyp intravenös injiziert und der Anteil der markierten Zellen mittels FACS-Analyse quantifiziert.

Bei den unbehandelten Kontroll-Tieren zeigt sich ein Anteil von $0,2 \pm 0,0 \times 10^6$ Granulozyten im Interstitium und $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$ PMN im Gefäßbett. Der Anteil der intravasalen adhärenenten Granulozyten änderte sich im Zeitverlauf des LPS induzierten ARDS nicht. Die Anzahl der interstitiellen Granulozyten nahm jedoch innerhalb der ersten 24 Stunden auf $5,3 \pm 1,1 \times 10^6$ Zellen zu. 48 Stunden nach der LPS-Instillation befanden sich schon $10,3 \pm 0,7 \times 10^6$ Granulozyten im Lungengewebe. Nach 72 Stunden war die Zellzahl wieder bei $5,5 \pm 0,4 \times 10^6$ Zellen. Am 5. Tag nach der Stimulation war der Ausgangswert wieder erreicht.

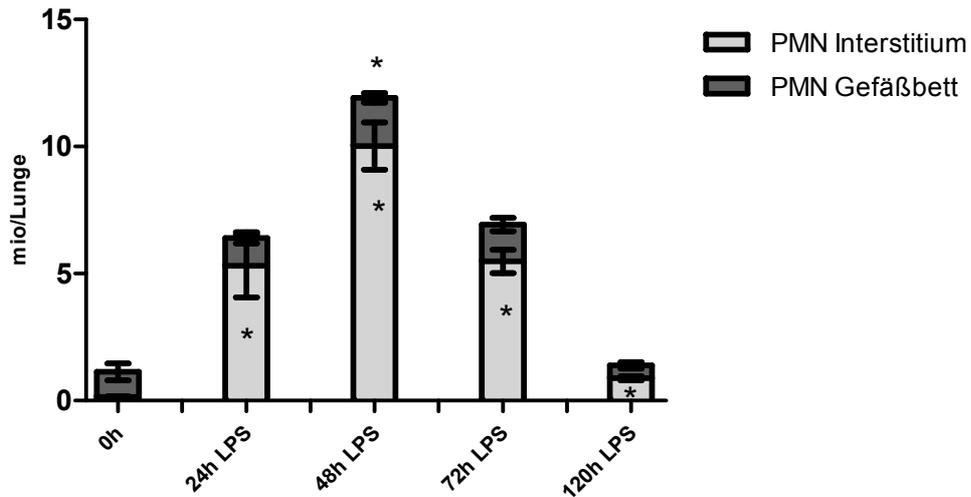


Abbildung 20 Quantifizierung der interstitiellen und vaskulär-adhärenen Granulozyten im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.

Differenzierung der Granulozyten in interstitielle und vaskuläre Zellen durch FACS-Analyse bei Tieren nach LPS-Stimulation. Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit $t = 0h$; dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 4 - 6$ Tiere.

Die Tiere, die 24 Stunden nach der LPS-Gabe mit 1 ng VEGF behandelt wurden zeigten ein ähnliches Bild wie die LPS-Kontrollgruppe. Die Gruppe, der 10 ng VEGF instilliert wurde zeigte einen deutlich geringeren Anteil an interstitiellen Granulozyten, nämlich $8,1 \pm 0,9 \times 10^6$ Zellen. 72 Stunden nach LPS-Stimulation zeigten beide VEGF-behandelten Gruppen identische Verhältnisse, die Anzahl der interstitiellen Granulozyten lag deutlich unter dem Niveau der LPS-Gruppe bei $2,9 \pm 1,1$ (1 ng) bzw. $3,1 \pm 0,6 \times 10^6$ Zellen. Der Anteil an vaskulären Granulozyten war bei allen drei Gruppen identisch. Fünf Tage nach LPS-Instillation waren alle drei Gruppen wieder identisch.

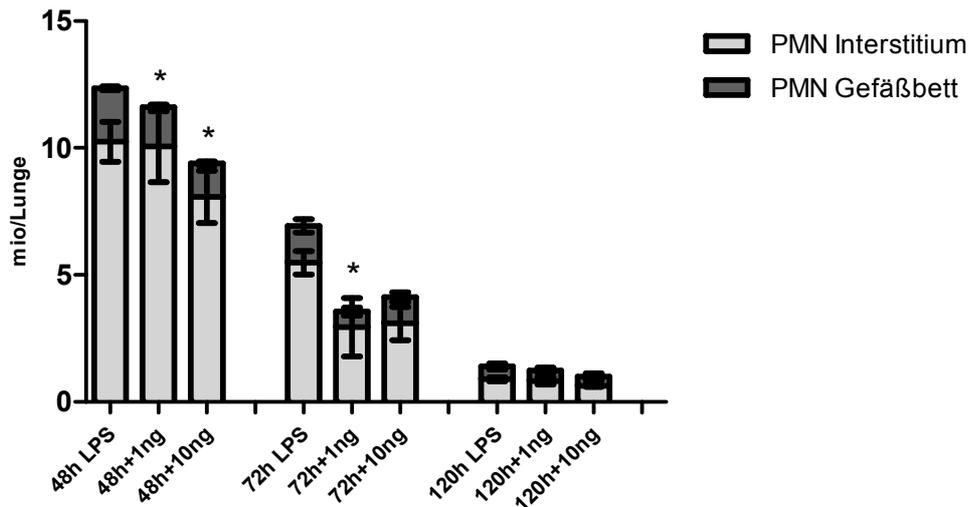


Abbildung 21 Quantifizierung der interstitiellen und vaskulär-adhärenen Granulozyten im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Tiere mit VEGF-Behandlung mit 1 ng bzw. 10 ng intratracheal 24 Stunden nach LPS-Applikation. Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe 48, 72 und 120 Stunden nach der LPS Stimulation. Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit der LPS-Gruppe; dargestellt sind MW \pm SEM, $n = 5 - 6$ Tiere.

3.3. Permeabilitätsstörung der alveolokapillären Barriere

Die Permeabilitätsstörung, die ein wichtiges Merkmal des ARDS ist, wurde mittels Messung des gesamten Proteingehaltes in der bronchoalveolären Lavage bestimmt.

Die Tiere wurden mit 10 µg LPS intratracheal stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert. Nach Lavage der Lungen wurde die so gewonnene Flüssigkeit mittels eines photometrischen Verfahrens auf ihren Gesamt-Proteingehalt untersucht. Bei unstimulierten Tieren lag der gemessene Wert bei $0,20 \pm 0,01$ µg/µl. Nach der LPS-Gabe stieg der Proteingehalt in der Lunge auf $0,33 \pm 0,07$ µg/µl nach 24 Stunden an, nach 48 Stunden liesen sich schon $0,59 \pm 0,02$ µg/µl nachweisen. 72 Stunden nach der Stimulation war dieser Wert auf sein Maximum $0,66 \pm 0,03$ µg/µl angestiegen. Fünf Tage nach Auslösen des ARDS entsprach die Proteinkonzentration wieder dem Ausgangswert.

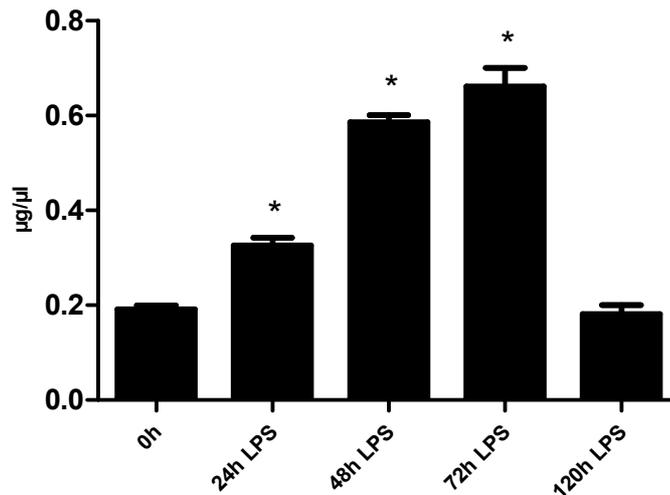


Abbildung 22 Gesamtproteingehalt in der BAL nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.

Die Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage im LPS-induzierten ARDS bei unbehandelten Tieren (0h) sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS. Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit $t = 0h$; dargestellt sind MW \pm SEM, $n = 5 - 6$ Tiere.

Die Tiere, die mit 10 ng VEGF 24 Stunden nach LPS-Gabe behandelt wurden zeigten 48 Stunden nach der Stimulation ein ähnliches Bild wie die LPS-Kontrollgruppe. Die Proteinkonzentration war allerdings bei der Gruppe, die 1 ng VEGF intratracheal erhielt, geringer als in den beiden anderen Gruppen, sie lag bei $0,44 \pm 0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. 72 Stunden nach der LPS-Instillation war der Proteingehalt in der BAL in der mit 10 ng VEGF behandelten Gruppe ähnlich dem der Kontrollgruppe. Bei den Tieren, die 1 ng VEGF erhielten war der Wert deutlich geringer als bei der LPS-Gruppe. Diese Tiere hatten im Mittel $0,49 \pm 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein in der Lavage-Flüssigkeit. Fünf Tage nach der Stimulation waren alle drei Gruppen wieder auf dem gleichen Stand, wie vor Eingabe des Lipopolysaccharids.

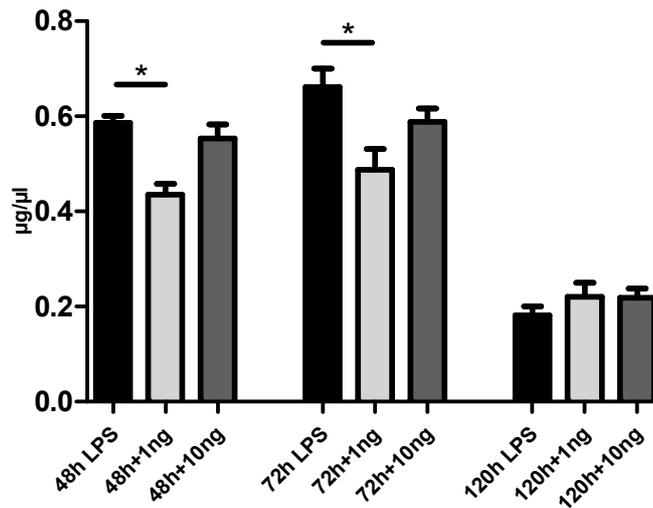


Abbildung 23 Gesamtproteingehalt in der BAL nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Vergleich der Gruppen 48, 72 und 120 Stunden nach LPS-Stimulation. Behandlung der Tiere 24 Stunden nach LPS-Gabe mit unterschiedlicher VEGF-Menge.

Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit der LPS-Gruppe; dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 5 - 6$ Tiere.

3.4. Zytokin-Synthese

Zur Evaluierung der inflammatorischen Antwort wurden die beiden pro-inflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose Faktor(TNF- α) und Makrophagen Inflammatorisches Protein(MIP-2) in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit mittels ELISA bestimmt. Beide Zytokine werden in der Pathogenese des ARDS gebildet und unterhalten die Entzündungsreaktion (siehe 1.1.7).

3.4.1. Tumor-Nekrose Faktor (TNF- α)

TNF wurde bei Tieren ohne Stimulation in der bronchoalveolären Lavage gemessen, die Werte waren extrem gering, im Mittel 71 ± 10 pg/ml. Nach der Instillation von LPS stieg dieser Wert innerhalb der ersten 24 Stunden auf 1398 ± 134 pg/ml an. Wieder 24 Stunden später war dieser hohe Wert wieder auf den ursprünglichen Wert gesunken. Dies war auch zu allen späteren Zeitpunkten der Fall.

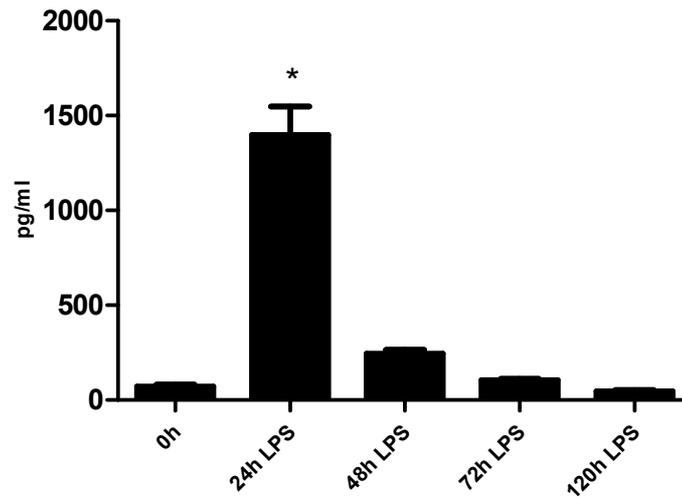


Abbildung 24 TNF- α Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 μ g LPS i.t.

Die Tiere wurden mit LPS stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert und die Lunge lavagiert. Die TNF- α Werte wurden mittels ELISA bestimmt.

Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit $t = 0h$; dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 5 - 6$ Tiere.

In den Gruppen, die 24 Stunden nach der LPS-Applikation intratracheal mit VEGF behandelt wurden, ergibt sich zu den Zeitpunkten 48, 72 und 120 Stunden nach der LPS-Gabe ein identisches Bild, alle Werte entsprechen denen der LPS-Gruppe und sind im Bereich der *Baseline*.

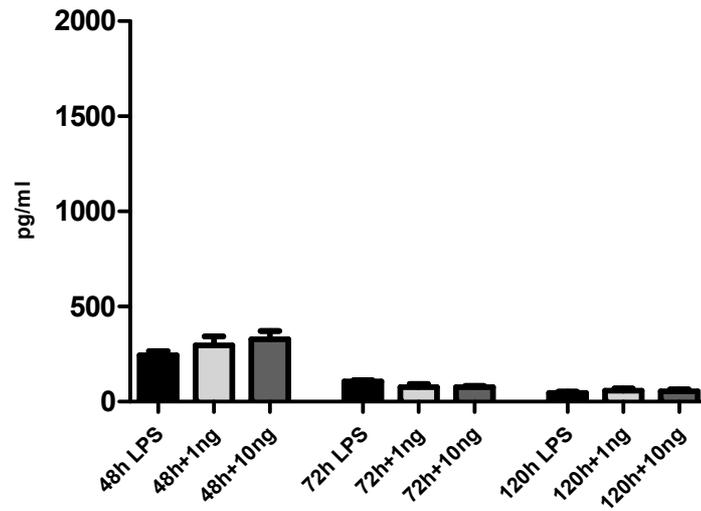


Abbildung 25 TNF- α Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 μ g LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Die Tiere wurden 24 Stunden nach der LPS-Instillation mit 1 ng bzw. 10 ng VEGF intratracheal behandelt, später euthanasiert und die Lunge lavagiert. Gezeigt sind die Werte im Vergleich zu den LPS-Kontrollen. Dargestellt sind MW \pm SEM, n = 5 - 6.

3.4.2. Makrophagen Inflammatorisches Protein (MIP-2)

MIP-2 ist ein weiteres pro-inflammatorisches Protein, das von verschiedenen Zelltypen nach einem inflammatorischen Stimulus gebildet wird.

Die Werte dieses Zytokins korrelieren mit denen von TNF- α . Die Basiswerte ohne Stimulation sind sehr niedrig, 54 ± 8 pg/ml. 24 Stunden nach der LPS-Applikation stiegen die MIP-2 Spiegel auf fast das 10-fache, 519 ± 151 pg/ml, an, um dann schnell wieder auf die Ausgangswerte abzusinken.

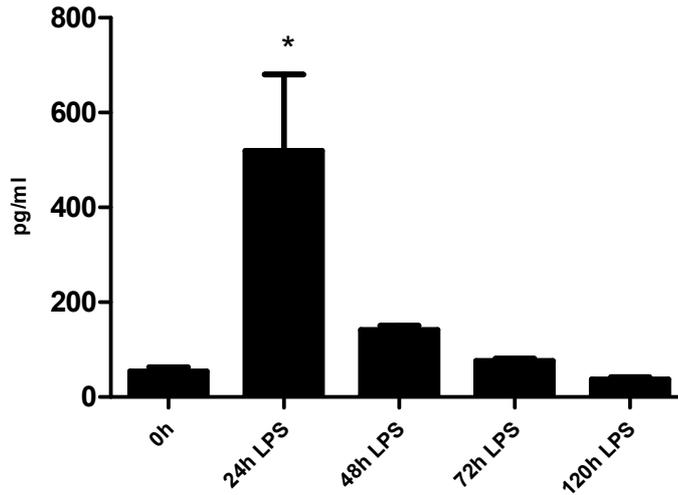


Abbildung 26 MIP-2 Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.

Mäuse wurden mit LPS intratracheal stimuliert, zu verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert und die Lungen bronchoalveolär lavagiert. Aufgetragen sind die mittels ELISA ermittelten MIP-2 Werte zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit $t = 0h$; dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 5 - 6$ Tiere.

Die Tiergruppen die mit 1 ng bzw. 10 ng intratracheal 24 Stunden nach LPS-Gabe behandelt wurden zeigen zu den Zeitpunkten 48, 72 und 120 Stunden nach LPS-Instillation keine Unterschiede zu der LPS-Kontrollgruppe.

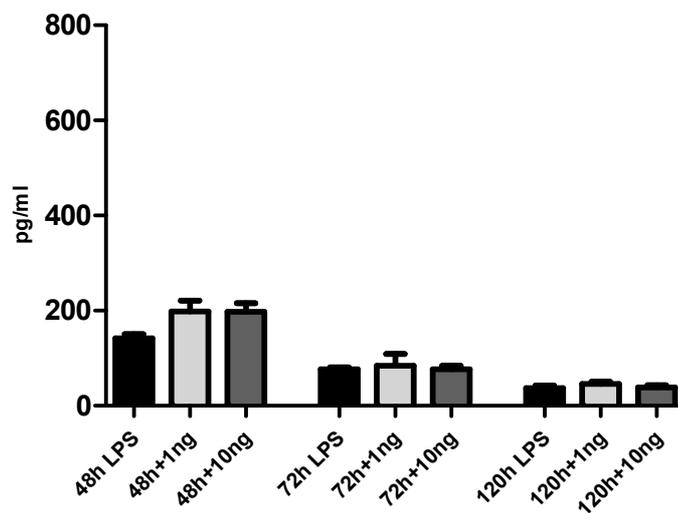


Abbildung 27 MIP-2 Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

24 Stunden nach der LPS-Stimulation wurden zwei Gruppen mit 1 ng bzw. 10 ng VEGF intratracheal behandelt. Die Werte sind im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe zu den

Zeitpunkten 48, 72 und 120 Stunden nach LPS-Gabe abgebildet. Dargestellt sind MW \pm SEM, n = 5 - 6.

3.5. VEGF-Proteingehalt

3.5.1. VEGF in der BAL

Der VEGF-Proteingehalt in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit wurde mittels eines ELISA bestimmt. Die Tiere wurden mit 10 μ g LPS intratracheal behandelt und dann zu verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert und die Lungen lavagiert. Bei unbehandelten Tieren war der VEGF-Spiegel in der Lunge im Vergleich zum Plasma recht hoch, er lag bei 37 ± 3 pg/ml. Nach der LPS-Gabe stieg dieser Wert um das fünffache auf 190 ± 25 pg/ml an, um dann über die nächsten zwei Tage wieder auf das ursprüngliche Niveau abzusinken.

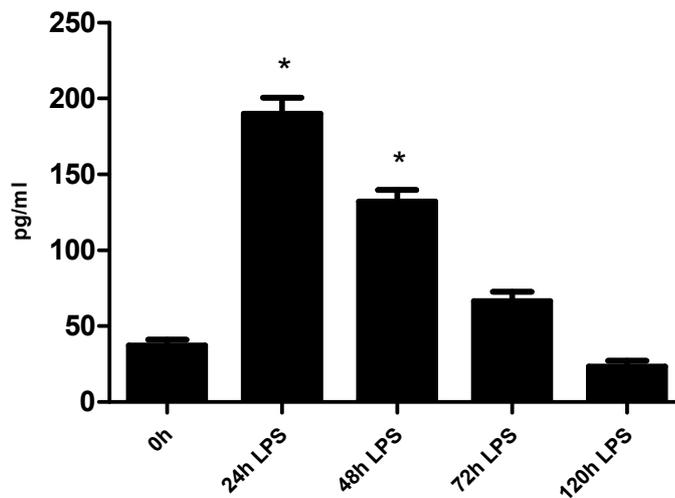


Abbildung 28 VEGF-Protein Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 μ g LPS i.t.

Nach Stimulation mit LPS wurden die Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert und die Lunge lavagiert. Gezeigt sind die VEGF-Protein Werte vor und nach der Stimulation. Signifikanz (*) $p < 0,05$ im Vergleich mit t = 0h; dargestellt sind MW \pm SEM, n = 5 - 6 Tiere.

Die Tiere, die 24 Stunden nach der LPS-Instillation mit VEGF behandelt wurde zeigten zu den Zeitpunkten 48, 72 und 120 Stunden nach Versuchsbeginn identische Werte zu der LPS-Gruppe.

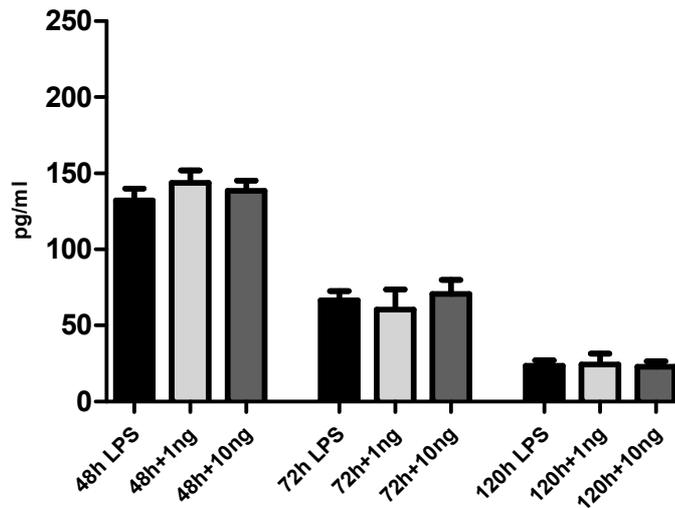


Abbildung 29 VEGF-Protein Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Die Tiere wurden 24 Stunden nach Auslösen des ARDS mit 1 ng bzw. 10 ng VEGF intratracheal behandelt und dann zu verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert und lavagiert. Dargestellt sind MW ± SEM, n = 5 – 6.

3.5.2. VEGF im Blutplasma

Die VEGF-Protein-Werte im Blutplasma bei unstimulierten Tieren lagen deutlich niedriger als in der Lunge, daher musste ein anderes ELISA-Kit eingesetzt werden, das diese niedrigen Werte sensitiv nachweisen kann. Der Wert lag physiologisch bei $6,9 \pm 0,6$ pg/ml, weniger als ein Viertel des Wertes, der in der BAL gemessen wurde. Im Zeitverlauf des LPS-induzierten ARDS zeigte sich eine geringe Reduktion bereits nach 24 Stunden, allerdings war dies erst 72 Stunden nach LPS-Gabe signifikant. Fünf Tage nach der Auslösung des ARDS war der Wert wieder auf den Ausgangswert angestiegen.

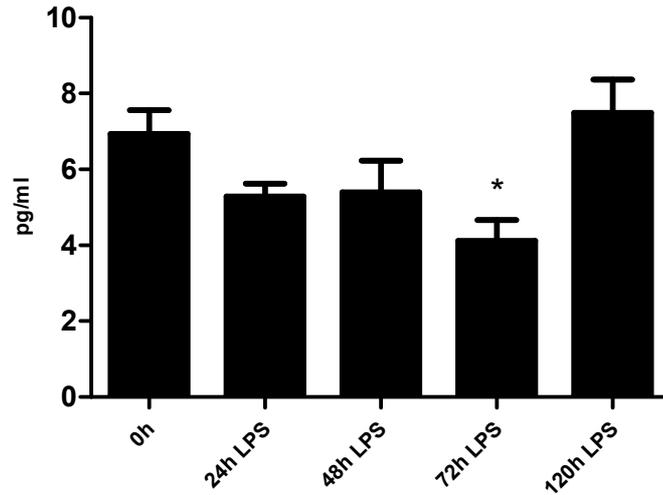


Abbildung 30 VEGF-Protein Spiegel im Blut nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.

Nach LPS-Gabe wurden die Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert und Blut entnommen. Gezeigt sind die VEGF-Protein Werte vor und nach der Stimulation.

Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit $t = 0h$; dargestellt sind MW \pm SEM, $n = 5 - 6$ Tiere.

Nach Behandlung mit VEGF, 24 Stunden nach der LPS-Applikation, zeigte die Gruppe, die 1 ng erhielt, bei 48 Stunden einen Anstieg von VEGF im Blut auf $7,7 \pm 0,7$ pg/ml, der allerdings verglichen mit $5,3 \pm 1,0$ pg/ml (LPS-Gruppe) nicht signifikant war. Die Gruppen waren nach fünf Tagen alle wieder auf dem ursprünglichen Niveau.

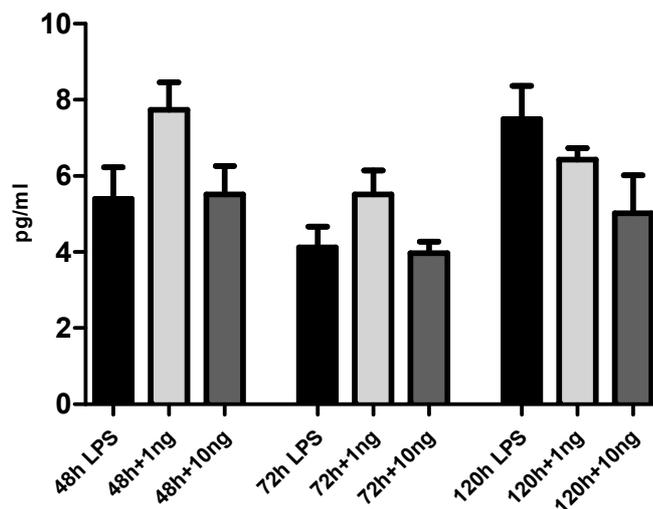


Abbildung 31 VEGF-Protein Spiegel im Blut nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Die Tiere wurden 24 Stunden nach Auslösen des ARDS intratracheal mit 1 ng bzw. 10 ng VEGF behandelt und dann zu verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert, dann Blut entnommen und mittels ELISA die VEGF-Werte im Plasma bestimmt. MW \pm SEM, $n = 6$.

3.6. Leukozyten im peripheren Blut

3.6.1. Anzahl der Blut-Leukozyten

Nachdem die Tiere mit LPS stimuliert waren und euthansiert wurden, wurde ihnen noch peripheres Blut aus der kaudalen Hohlvene entnommen. Dieses Blut wurde mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie untersucht. So wurde der Gesamtgehalt an Leukozyten gemessen. Die Werte variieren inter-individuell sehr stark, die Streuung bei diesem Parameter war folglich sehr groß. Daher sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten nicht signifikant. Dennoch nahm 24 Stunden nach der LPS-Gabe der Leukozytengehalt im peripheren Blut von $2,0 \pm 0,1 \times 10^6$ Zellen auf $1,2 \pm 0,2 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter deutlich ab. 72 Stunden nach der Stimulation wurde ein deutlicher Anstieg der Leukozytenkonzentration im Blut auf über 3 Millionen Zellen pro Milliliter beobachtet.

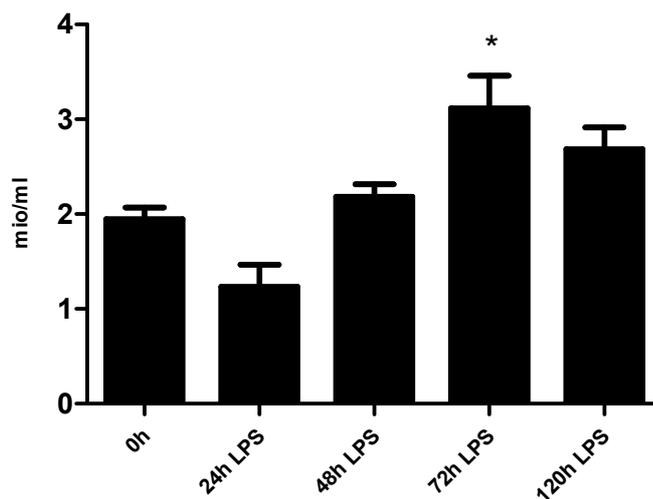


Abbildung 32 Leukozytenanzahl im peripheren Blut nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.

Die Tiere wurden mit LPS stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten danach das Blut auf die Leukozytenanzahl untersucht. Signifikanz (*) $p < 0,05$ verglichen mit $t = 0h$; dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 5 - 6$ Tiere.

Bei den Tieren, die mit 1 ng bzw. 10 ng VEGF intratracheal behandelt wurden, ergab sich durch die individuelle Streuung ein ähnliches Bild. Die Werte unterscheiden sich kaum von denen der Kontrollgruppe

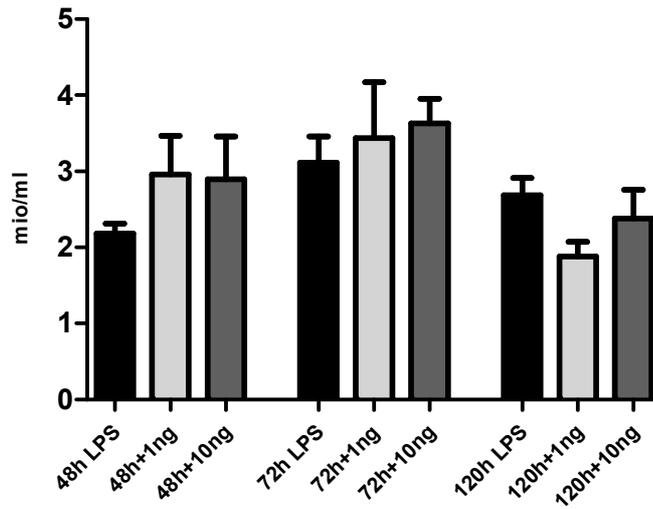


Abbildung 33 Leukozytenanzahl im peripheren Blut nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Die Tiere wurden 24 Stunden nach der LPS-Instillation mit VEGF behandelt. Dargestellt sind die Blutleukozyten im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe, MW ± SEM, n = 5 - 6.

3.6.2. Differenzierung der Blut-Leukozyten

Aus dem gewonnenen Blut wurden die Leukozyten durch Lyse der Erythrozyten isoliert und ausgezählt. Bei der Differenzierung ergab sich in der Gruppe der Tiere, die mit LPS stimuliert wurden ein Anteil von 7 ± 2 % Monozyten/Makrophagen, 6 ± 2 % Granulozyten und 86 ± 4 % Lymphozyten. 24 Stunden nach der Auslösung des ARDS stieg der Anteil der Granulozyten auf 16 ± 4 %, die Lymphozyten sanken entsprechend, während der Anteil der Monzyten und Makrophagen gleich blieb. Dieses Verhältnis war auch nach 48 Stunden nachweisbar, erst 72 Stunden nach der Stimulation sank der Anteil der Granulozyten wieder auf den Ausgangswert, die ursprünglichen Verhältnisse waren wieder hergestellt, was sich bis zum Versuche nicht mehr änderte.

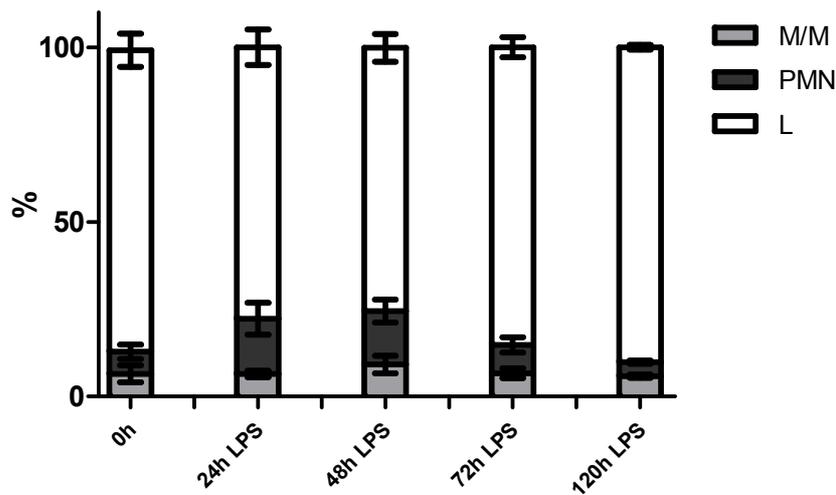


Abbildung 34 Leukozytendifferenzierung im peripheren Blut nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.

Die Tiere wurden mit LPS stimuliert, das Blut zu verschiedenen Zeitpunkten im Hinblick auf die Leukozytenpopulationen analysiert.

Dargestellt sind MW ± SEM, n = 5 - 6. M/M steht für Monozyten/Makrophagen, PMN für Granulozyten und L für Lymphozyten.

24 Stunden nach der LPS-Gabe mit VEGF behandelte Mäuse zeigten zu keinem Zeitpunkt deutliche Unterschiede zur LPS Gruppe, die Verhältnisse waren stets identisch.

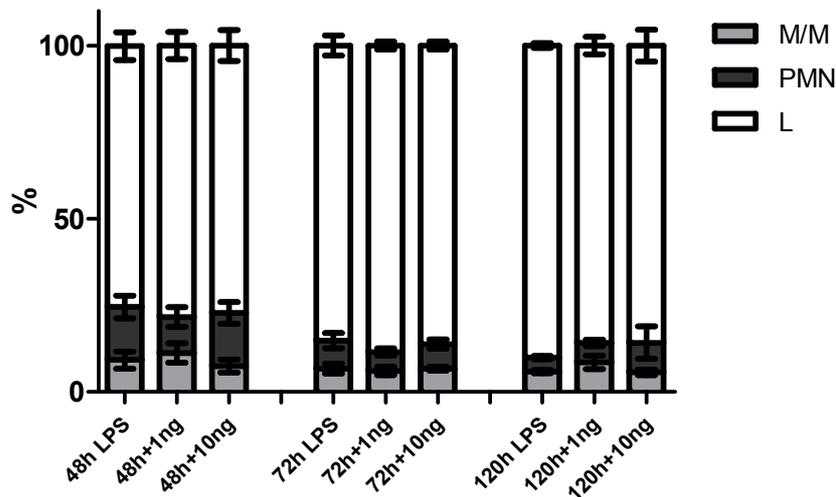


Abbildung 35 Leukozytendifferenzierung im peripheren Blut nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Die Tiere wurden mit LPS stimuliert, 24 Stunden später mit VEGF behandelt und die im Blut befindlichen Leukozyten zu verschiedenen Zeitpunkten differenziert. Abgebildet sind die Werte 48, 72 und 120 Stunden nach Stimulation im Vergleich zur LPS-Gruppe.

Dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 5 - 6$. M/M steht für Monozyten/Makrophagen, PMN für Granulozyten und L für Lymphozyten.

3.7. Gewichtsverlauf

Zur Überwachung des Zustandes der Tiere wurden sie täglich gewogen. Nach Applikation von LPS wurde eine deutliche Gewichtsabnahme innerhalb der ersten 24 Stunden verzeichnet, die bei der LPS Gruppe bis 72 Stunden nach Stimulation anhielt. In den beiden folgenden Tagen nahmen die Tiere wieder an Gewicht zu und erreichten am fünften Tag ihr Ausgangsgewicht. Die Tiere, die 24 Stunden nach LPS-Gabe 1 ng VEGF intratracheal erhielten, zeigten bereits 48 Stunden nach LPS-Instillation ein verbessertes Allgemeinbefinden, was sich in einer deutlichen Steigerung des Gewichtes zeigte. Die Tiere waren wieder auf fast 95 % ihres Ausgangsgewichtes während die Kontrollgruppe nur 91 % des ursprünglichen Gewichtes aufwies. Die Tiere, die 10 ng VEGF erhielten, zeigten ebenfalls eine Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe, diese war jedoch weniger ausgeprägt als in der geringer dosierten Behandlungsgruppe.

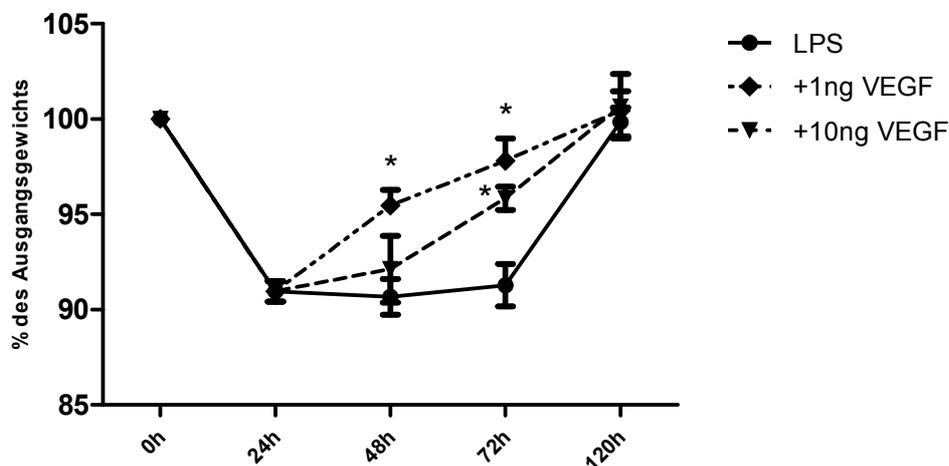


Abbildung 36 Gewichtsverlauf der Mäuse nach Stimulation mit 10 μ g LPS i.t. und Behandlung mit VEGF

Die Tiere wurden mit LPS stimuliert, 24 Stunden später mit VEGF behandelt und täglich gewogen. Abgebildet sind die Werte in % bezogen auf das Ausgangsgewicht.

Dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 6$, Signifikanz (*) verglichen mit $t = 0h$ liegt bei $p < 0,05$.

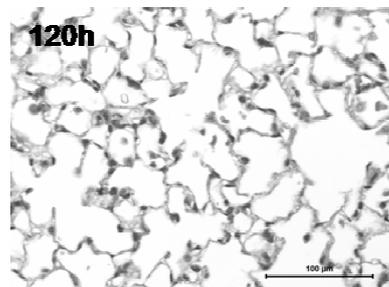
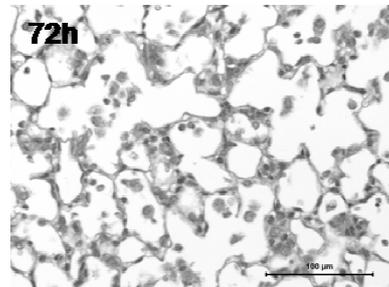
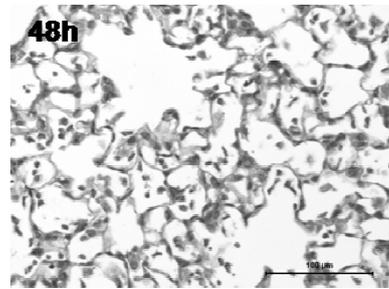
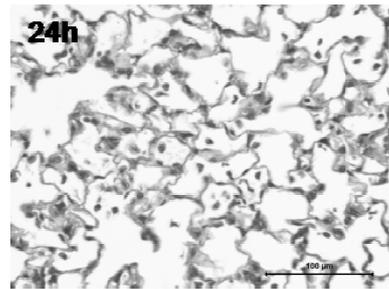
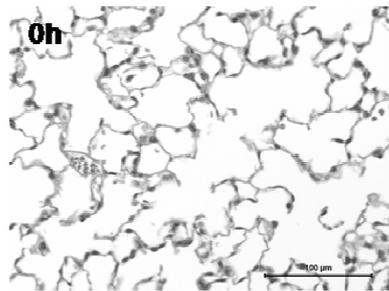
3.8. Histologie

Für die Herstellung der histologischen Präparate wurden die Tiere mit LPS stimuliert, dann euthanasiert und die Lungen mit Formalin fixiert und schließlich in Paraffin eingebettet. Bei unstimulierten Tieren (0 h) kann man gut die Morphologie der gesunden Lunge erkennen. Die Alveolarsepten sind dünn und die Alveolen frei, es befinden sich praktisch keine Zellen im Alveolarraum.

24 Stunden nach der LPS-Instillation verändert sich das Bild. Es kommt zu einer Verdickung der Alveolarsepten, Protein und Zellen sind in den Alveolen sichtbar. Diese Zellen sind sowohl Leukozyten, v.a. Granulozyten, als auch Erythrozyten. 48 Stunden nach der Stimulation ist noch mehr Protein in den Alveolen nachweisbar, die Zellen füllen einzelne Alveolen fast aus. Es kommt zu größeren luftgefüllten Hohlräumen durch Zerstörung des Gewebes. Auch Kollaps einzelner Alveolen ist zu beobachten. Am dritten Tag nach Auslösen des ARDS zeigen sich nun vermehrt Makrophagen in den Alveolen, die Anzahl der Granulozyten geht zurück. Es befinden sich aber immer noch viele Zellen in den Septen, die dadurch stark verdickt erscheinen. Auch Protein ist noch in großer Menge in den Alveolen sichtbar. Fünf Tage nach LPS-Gabe sind die Alveolen größtenteils wieder frei, die Septen sind jedoch noch verdickt und erscheinen teils blasig. Es sind außerdem noch einige Leukozyten in den Alveolarsepten zu finden.

Bei den Tieren, die 24 Stunden nach der LPS-Gabe mit 1 ng VEGF behandelt wurden, ergibt sich zum Zeitpunkt 48 Stunden ein etwas anderes Bild. Es befinden sich deutlich weniger Zellen und Protein in den Alveolarräumen. In den Septen sind allerdings ebenso viele Zellen wie in der LPS-Gruppe zu finden. 72 Stunden nach Stimulation ist der Unterschied zwischen Kontroll-Gruppe und der behandelten Gruppe nicht mehr allzu groß, allerdings fällt auf, dass mehr Makrophagen in den Alveolarräumen sind und weniger Granulozyten. Fünf Tage nach Auslösen des ARDS sind die beiden Gruppen wieder völlig identisch.

Die Mäuse, die 24 Stunden nach der Stimulation mit 10 ng VEGF behandelt wurden, zeigen nach 48 Stunden ein ähnliches Bild wie die LPS-Gruppe. Es sind ähnlich viele Zellen sowohl in den Alveolarsepten als auch in den Alveolen selbst, ebenso ist die Menge an Protein vergleichbar. 72 Stunden nach LPS-Applikation sieht die Lunge makroskopisch schlechter aus, als in den beiden anderen Gruppen. Die Septen sind stark verdickt, viele Zellen befinden sich in den Alveolen. Doch fünf Tage nach der Stimulation entspricht das Bild wieder dem der beiden anderen Gruppen.



Histologische Schnitte der Lungen nach 10 µg LPS lt. ohne und mit Behandlung mit VEGF

Die Tiere wurden mit LPS intratracheal stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Lungen entnommen, in Paraffin eingebettet und die Schnitte mit H&E Färbung gefärbt. Links ist die Zeitreihe unter LPS dargestellt, in der Mitte die Gruppe, die mit 1 ng VEGF i.t. 24 Stunden nach LPS behandelt wurde zu den Zeitpunkten 48, 72 und 120 Stunden. In der rechten Spalte ist die Gruppe, die 10 ng VEGF erhielt. Die Bilder sind repräsentativ für 6 Tiere. Der Größenmarker entspricht 100µm.

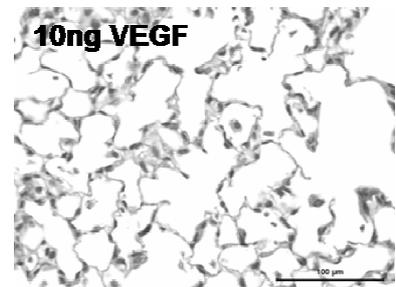
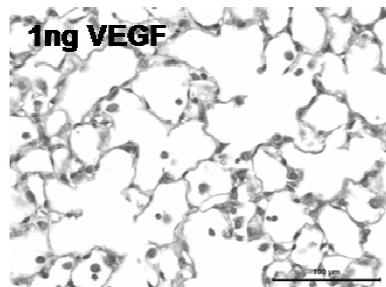
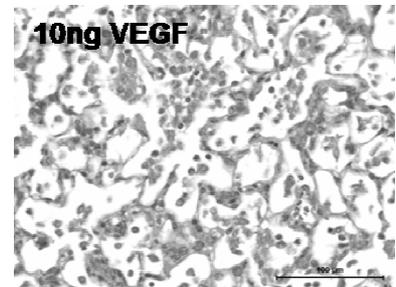
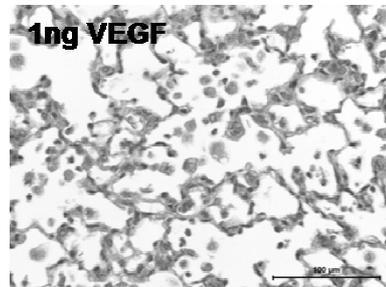
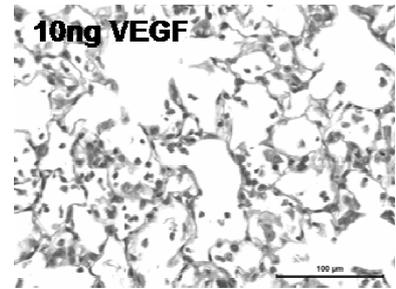
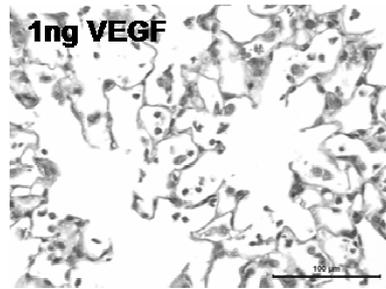


Abbildung 37 Histologie-Schnitte mit H&E-Färbung

4. Diskussion

4.1. LPS-Instillation als Tiermodell des ARDS

Das Tiermodell der LPS-induzierten respiratorischen Insuffizienz ist eines der Standardmodelle zur Untersuchung des ARDS. Es zeigte im Versuch ähnliche Merkmale wie die Krankheit beim Menschen. Wichtige Charakteristika wie die diffuse Entzündung der Lunge, Ödembildung, neutrophile Infiltration der Alveolen sowie erhöhte Produktion von Zytokinen wurden durch das Modell reproduziert. Weitere Parameter wie Koagulopathie, Herzfunktionsstörung sowie Hypoxämie wurden nicht bestimmt. Darüber lässt sich also keine Aussage treffen. Die Bestimmung dieser Werte ist jedoch auch, durch die Größe der Tiere, mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Andere Charakteristika wie überschießende Reparationsvorgänge mit Fibrosierung des Lungengewebes konnten nicht nachgewiesen werden, treten beim Menschen aber auch nicht bei allen Patienten auf. Für diese Fragestellung wäre ein anderes Modell, das Modell der Bleomycin-induzierten Fibrose besser geeignet gewesen. Hier ergibt sich initial eine respiratorische Insuffizienz, die nach 11 Tagen in eine fibrotische Veränderung der Lunge übergeht (Matute-Bello et al., 2008; Moore and Hogaboam, 2008).

Das Modell der LPS-induzierten respiratorischen Insuffizienz ist ein Modell, das gut etabliert ist und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Es ist eines der am häufigsten verwendeten Modelle im Bereich der respiratorischen Insuffizienz, wie Publikationszahlen belegen (Matute-Bello et al., 2008). Die Herangehensweise ist in diesem Modell unterschiedlich, z.T. wird LPS intravenös verabreicht, es kommt primär zu einer Endothelschädigung und erst sekundär zu einer Schädigung der Lunge. Dies entspricht aber eher einem Sepsis-Model als einem reinen Lungenschädigungsmodell. In dieser Arbeit wurde ein anderer Administrations-Weg gewählt: das LPS wurde in die Trachea eingegeben und konnte so eine spezifische Lungenschädigung auslösen. So wurden systemische Nebeneffekte vermieden. Diese Applikation entspricht einer Schädigung der Lunge durch Bakterien, die auf respiratorischem Weg in die Lunge gelangten und dort eine Entzündung auslösen. Da die Applikation von LPS aber nur einen einmaligen Stimulus bedeutet und die Entzündung steril ist, wird die bakterielle Infektion der Lunge so nur unvollständig reproduziert. Dies ist sicher einer der gravierendsten Nachteile des Modells. Allerdings können bei Patienten, die mit Antibiotika behandelt wurden, nach kurzer Zeit

ebenfalls keine Bakterien mehr aus dem Sputum angezüchtet werden, die Entzündungsreaktion bleibt aber auch beim Patienten bestehen und verschlimmert sich weiterhin.

Das verwendete Modell ist ein eher mildes Modell der respiratorischen Insuffizienz, die Permeabilitätsstörung ist relativ gering und bei der verwendeten Dosis ist keine Letalität zu beobachten. Doch die wichtigen Parameter, die in dieser Arbeit untersucht wurden, waren zum einen die Transmigration und zum anderen die Resolution der Entzündung, daher war dieses Modell für den Versuch gut geeignet.

Die gewählte Dosis ist ebenfalls als eher niedrig einzustufen, doch sind BALB/c-Mäuse sehr empfänglich für LPS, so dass die instillierte Menge ausreicht, um eine Entzündungsreaktion auszulösen. Der verwendete Inzuchtstamm weist außerdem gute immunologische Reaktionen auf und zeigt daher besonders gut die Immunantwort, die auch beim Patienten zu beobachten ist.

4.2. VEGF-Regulation im ARDS

In der Pathogenese des ARDS wird eine Beteiligung von VEGF vermutet, da es ein potenter Permeabilitätsfaktor ist und ein Hauptmerkmal des ARDS die erhöhte Permeabilität der alveolokapillären Barriere darstellt.

Karpaliotis et al. zeigten in einem Modell der LPS-induzierten respiratorischen Insuffizienz mittels Immunhistologie, dass nach dem Stimulus die VEGF-Konzentration in der Lunge erhöht war. Ebenfalls wiesen sie eine erhöhte Expression der mRNA von VEGF im Lungenhomogenat nach (Karpaliotis et al., 2002). Eine andere Gruppe wies im Infektionsmodell (*Pseudomonas aeruginosa*) eine Reduktion von VEGF Protein und mRNA in der initialen Phase nach. Sie verwendeten ELISA und Western Blot zur Detektion des Proteins und PCR bzw. Northern Blot zum Nachweis der mRNA. In dieser Veröffentlichung wird außerdem auf Patientendaten hingewiesen, die zeigen, dass ARDS Patienten einen deutlich niedrigeren Spiegel an VEGF Protein in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit aufwiesen als Patienten ohne ARDS (Maitre et al., 2001).

Im Modell der Hyperoxie-bedingten Lungenschädigung konnten Ekekezie et al. eine Verringerung sowohl der VEGF mRNA als auch des Proteins nachweisen. In diesem Fall wurden die Proteinwerte aus dem Lungenhomogenat bestimmt. Der Anteil des lavagierbaren VEGF stieg auch in diesem Modell an (Ekekezie et al., 2003).

Da in diesen Publikationen derart unterschiedliche Regulationen von VEGF in verschiedenen Tiermodellen des ARDS beschrieben wurden und sich aufgrund der Wahl der Methoden kein generelles Bild ergab, konzentrierte sich der erste Teil der Arbeit darauf, die tatsächliche Regulation im verwendeten Model festzustellen.

Die PCR-Daten aus den beiden Kompartimenten Alveolarepithel und Gefäßendothel der Lunge lassen eine primäre Regulation in Epithelzellen, nicht aber in Endothelzellen vermuten. Die mRNA von VEGF und den beiden Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 war in den Endothelzellen praktisch nicht reguliert, wohingegen die Epithelzellen sowohl bei VEGF selbst als auch bei seinem Rezeptor Flk-1 eine deutliche negative Regulation der mRNA aufwiesen. Dies könnte ein Gegenregulationsmechanismus des Epithels darstellen. Da im ARDS die Barrierenfunktion gestört wird und VEGF die Permeabilität noch weiter erhöht, könnte das Epithel die Expression von VEGF reduzieren um ein „Fluten“ der Alveolen zu verringern. Eine andere Erklärung wäre ein vermehrter Abbau der mRNA durch RNasen oder Mikro RNAs durch den inflammatorischen Stimulus. Diese Ergebnisse sind erstaunlich, da eine Regulation in Endothelzellen als wahrscheinlicher angenommen wurde, da VEGF ein endothelialer Wachstumsfaktor ist.

Der offensichtliche Anstieg des VEGF-Proteingehaltes in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit im Versuch ist aber daher nicht auf die erhöhte Expression im Epithel zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung wäre die Degranulation von neutrophilen Granulozyten. Diese Zellen wandern im Verlauf der Erkrankung massenhaft in die Lunge ein und es ist bekannt, dass sie in ihren Granula VEGF speichern (Gong and Koh, 2010). Ob dieses VEGF allerdings biologisch aktiv ist, darüber lässt sich durch einen ELISA keine Aussage treffen. Hier könnten auch kürzere, gespaltete Fragmente von VEGF gebunden werden und ein positives Ergebnis liefern. VEGF ist ein wenig stabiles Protein, es wird schnell durch Proteasen abgebaut. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass VEGF an den löslichen Flt-1 gebunden ist und somit nicht aktiv ist (Kendall and Thomas, 1993). Untersuchungen zur Aktivität bzw. Intaktheit des VEGF-Proteins sollten daher noch durchgeführt werden, um weitere Aussagen diesbezüglich zu treffen.

Erstaunlich ist die Tatsache, dass sich der alveoläre Spiegel des VEGF Proteins nicht erhöht, wenn exogenes VEGF intratracheal eingegeben wird. Ursächlich könnte sein, dass der Zeitraum zwischen Eingabe und Untersuchung mit 24 Stunden zu lang ist und das rekombinante Protein zu schnell durch Proteasen abgebaut wird. Als Alternative käme die Aufnahme von VEGF über die alveolokapilläre Barriere in den Blutkreislauf in Betracht.

Dafür würde eventuell sprechen, dass sich der Plasmaspiegel von VEGF durch die Behandlung tendenziell erhöht, da dies jedoch nur unter Behandlung mit 1 ng VEGF der Fall ist, ist dies eher als unwahrscheinlich einzustufen. Die höhere Dosis VEGF führt zu keiner Veränderung der VEGF-Spiegel in Alveolarraum oder Blut.

Da VEGF im Tiermodell im Zeitverlauf des ARDS reguliert wird, liegt die Vermutung nahe, dass es eine Rolle in der Pathogenese spielt. Allerdings kann dies nicht abschließend bestätigt werden, da es für derartige Aussagen weiterer Untersuchungen bedarf. Eine vollständige Depletion des Proteins und seiner Rezeptoren führt in KO-Tieren jedoch zu letalen Phenotypen, auch wenn der Knock-out lungenspezifisch ist. Daher konnten entsprechende Versuche nicht durchgeführt werden. Die Blockade des Rezeptors oder die Verringerung des biologisch aktiven VEGF durch applizierte Antikörper wäre ein weiterer Ansatzpunkt, dies wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht. Daten zur Hemmung von VEGF durch seinen löslichen Rezeptor sFlt-1 sind bereits erhältlich und zeigen eine Verringerung von inflammatorischer Antwort und Fibrose im Bleomycin Model (Hamada et al., 2005). Ebenso mildert die Applikation des Flk-1-Inhibitor SU5416 die initiale Entzündung sowie die spätere Fibrose im gleichen Model (Ou et al., 2009).

4.3. Auswirkungen auf die Leukozytenrekrutierung

Im Zeitverlauf des ARDS kommt es zu einer massiven Rekrutierung von Leukozyten in den Alveolarraum. Im verwendeten Tiermodell ist dies ebenfalls zu beobachten. Nach LPS-Stimulation wandern innerhalb von 24 Stunden zwei bis drei Millionen Leukozyten in die Lunge ein, hauptsächlich neutrophile Granulozyten (siehe Abbildung 12, Abbildung 14).

Unter Behandlung mit VEGF wandern deutlich weniger Leukozyten in den Alveolarraum ein. Daher stellte sich die Frage, wo die Blockade der Transmigration stattfindet. Im Lungeninterstitium ließen sich mit VEGF-Applikation auch tendenziell weniger Leukozyten nachweisen als bei Tieren, die nicht mit VEGF behandelt wurden. Durch die Differenzierung in interstitielle und vaskuläre adhärente Leukozyten kann auch ein tendenziell geringerer Anteil an Leukozyten, die im Gefäßbett adhärent sind, nachgewiesen werden. Einzig im Blut befinden sich tendenziell mehr Leukozyten bei behandelten Tieren. Daher scheint die intratracheale Behandlung mit VEGF einen Block der Transmigration bereits am Gefäßendothel zu bewirken.

Bereits 1998 wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression von VEGF in Hautzellen die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen verstärkt (Detmar et al., 1998). 2009 wurde allerdings von Walshe et al. gezeigt (Walshe et al., 2009), dass eine Inhibition des VEGF-Signalweges im Endothel von Mesenterialgefäßen ein vermehrtes Rollen der Leukozyten und auch eine vermehrte Adhäsion bewirkt, was diesen Ergebnissen entgegensteht.

In bisherigen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass lokal injiziertes VEGF in der Haut von Ratten zu vermehrter Transmigration von Granulozyten und auch Monozyten in entzündete Gewebe führt (Zittermann and Issekutz, 2006). Dies ist auf den Effekt von VEGF auf Endothelzellen zurückzuführen.

Intratracheal verabreichtes VEGF ist jedoch nicht systemisch wirksam und bleibt auf das Lungenkompartiment beschränkt (Compernelle et al., 2002). Dies konnte im Versuch bestätigt werden, es wurde kein systemischer Anstieg von VEGF nachgewiesen. Daher könnte die beobachtete verringerte Transmigration von Granulozyten darauf zurückzuführen sein, dass eine Zelltyp-spezifische Reaktion in Endothelzellen hierfür nötig ist.

Im vorliegenden Versuch konnte eine Vermehrung der Monozyten-Transmigration unter Behandlung mit 1 ng VEGF gezeigt werden, die Anzahl der transmigrierten Granulozyten war bei beiden Dosierungen reduziert.

Dem steht entgegen, dass eine Verringerung der BAL-Zellen durch Inhibition des VEGF-Signalweges bewirkt werden konnte (Hamada et al., 2005). Doch könnte dies auch durch Aktivierung anderer Zellen wie der Leukozyten und Endothelzellen bedingt sein, dieser Effekt wurde durch die intratracheale Applikation verhindert. Allerdings zeigten Koh et al. 2007, dass eine Hemmung von VEGF eine vermehrte Transmigration von Neutrophilen bedingt, dies wird durch die vorliegenden Ergebnisse untermauert (Koh et al., 2007).

4.4. Effekt auf die Differenzierung der Leukozyten

Die Differenzierung der Leukozyten in der BAL ergab das bekannte Bild. In der gesunden Lunge sind praktisch nur Makrophagen nachzuweisen. Einen Tag nach LPS-Gabe wurden massenhaft Granulozyten in der Lavage gezählt, die dann graduell weniger wurden. Die Anzahl der Monozyten und Makrophagen nahm ab dem 3. Tag zu. Insgesamt war das Differentialbild nach fünf Tagen wieder mit dem einer gesunden Lunge vergleichbar.

Unter Behandlung mit 1 ng VEGF nahmen die Makrophagen am 3. Tag deutlich mehr zu als ohne Behandlung, scheinbar war der Stimulus durch die geringe Menge VEGF

ausreichend, um eine Migration dieser Zellen zu bewirken. Dies könnte auf ein vermehrtes *repair* hinweisen oder auf eine vermehrte Transmigration durch den Stimulus. Da in der Histologie der Lungen jedoch auch einige Zellen zu sehen sind, die bereits Granulozyten phagozytiert haben, lässt dies eher eine verstärkte Aufräumreaktion vermuten.

Makrophagen sind bekannt dafür, dass sie tote und sterbende Zellen phagozytieren können, ebenso wie zelluläre Überbleibsel, und so Entzündungsreaktionen des Körpers verringern (Herold et al., 2011).

Die Anzahl der Granulozyten war jedoch deutlich verringert, so dass der transmigrationsfördernde Effekt selektiv für die Makrophagen war. Eine Subpopulation von Makrophagen führt zu vermehrter Transmigration von neutrophilen Granulozyten (Brittan et al., 2012; Kreisel et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die neutrophilen Granulozyten durch vorher transmigrierte Makrophagen zu vermehrter Transmigration angeregt werden, der Influx der Granulozyten könnte also von mononukleären Zellen abhängig sein.

Bei den untersuchten Tieren konnte jedoch der Einstrom von Granulozyten vermindert und dennoch die Transmigration von mononukleären Zellen verstärkt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass VEGF an Rezeptoren bindet, die auf der Oberfläche von mononukleären Zellen exprimiert werden und diese so zur Migration anregt (Clauss et al., 1990) (siehe Abbildung 4).

Im Lungenhomogenat ergab sich ein ähnliches Bild wie in der BAL. In der gesunden Lunge befinden sich sowohl Lymphozyten als auch mononukleäre Zellen, die im Homogenat gezählten Granulozyten waren praktisch ausschließlich adhärente Zellen aus dem Gefäßbett. Nach Stimulation mit LPS verdoppelte sich innerhalb von 24 Stunden die Gesamtzahl der Leukozyten im Homogenat, was auf die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten zurückzuführen war. Diese Zellen wurden 72 Stunden nach LPS Gabe wieder deutlich weniger um nach fünf Tagen den Ausgangswert zu erreichen. Unter Behandlung mit VEGF zeigten sich keine deutlichen Verschiebungen der Leukozytenpopulationen. Scheinbar hat die Behandlung bereits einen Einfluss auf die Transmigration vom Blutkreislauf in das Lungeninterstitium, da sich im alveolären Kompartiment deutliche Veränderungen zeigen, im interstitiellen Kompartiment jedoch nicht. Allerdings migriert nur ein kleiner Anteil der Leukozyten aus dem Interstitium in die Lunge, daher ist eine geringe Verschiebung im Interstitium eventuell nicht nachweisbar.

Das Differenzialblutbild zeigte einen Anteil von knapp 90 % Lymphozyten. Unter LPS-Stimulation ergab sich ein geringer Anstieg der Granulozyten nach 24 Stunden, der aber nach 72 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau zurückging. Die Unterschiede hier waren zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Auch hier ließen sich unter VEGF Behandlung keine Unterschiede zur LPS-Gruppe feststellen.

Die einzig relevanten Unterschiede in der Leukozytendifferenzierung zwischen Kontrollgruppe und den behandelten Gruppen konnten folglich im Alveolarraum verzeichnet werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Zellzahl und weist auf ein spezifisches Behandeln des Alveolarraumes hin. Im Hinblick auf die gravierenden systemischen Effekte von VEGF ist dies ein wichtiger Aspekt für die weitere Forschung.

4.5. Veränderung der Permeabilität der alveolokapillären Barriere

Die Steigerung der Permeabilität wurde gemessen durch Bestimmung der Proteinmenge in den Alveolen. Nach LPS-Applikation wurde ein Anstieg der Permeabilität innerhalb der ersten 24 Stunden gemessen. Die Proteinmenge in den Alveolen nahm bis 72 Stunden nach Auslösen des Lungenversagens weiter zu, erst nach 5 Tagen erreichte sie wieder den Ausgangswert. Dies deckt sich mit der erwarteten Permeabilitätssteigerung. Auch beim Menschen wird eine gesteigerte Permeabilität im ARDS beobachtet, hier führt das gebildete alveoläre Ödem zu massiven Einschränkungen im Sauerstoffaustausch.

Unter Behandlung mit 1 ng VEGF zeigte sich nach 48 Stunden eine deutliche Reduktion der Proteinmenge um 25 % in den Alveolen. Dies ist auch nach 72 Stunden noch nachweisbar. Nach 5 Tagen haben beide Tiergruppen wieder den Ausgangswert erreicht. Wurden die Tiere mit der 10-fach höheren Menge an VEGF behandelt, war zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied in der alveolären Proteinkonzentration messbar. Hieraus kann man ableiten, dass eine zu hohe Dosis des VEGF keinen positiven Effekt auf die Ausprägung des Syndroms hat. Eine noch viel höhere Dosis würde wahrscheinlich sogar gegenteilige Effekte haben, von Kaner et al. wurde bereits gezeigt, dass eine Überexpression von VEGF in gesunden Lungen zu einem Lungenödem führt (Kaner et al., 2000).

Zur Beurteilung der Permeabilitätsveränderung ist es nötig, sich die physiologischen Gegebenheiten in der Lunge vor Augen zu führen. Die alveolo-kapilläre Barriere wird durch zwei verschiedene Schichten gebildet. Eine dieser Schichten ist das mikrovaskuläre

Endothel, dessen Kontinuität durch Lücken, sogenannten *gaps* unterbrochen ist und das, wie in anderen Organen auch, nicht komplett dicht ist, um die Ernährung des Gewebes sicherzustellen. Zum anderen existiert das alveoläre Epithel, das deutlich dichter ist als die Endothelzellschicht. Dies liegt an der Ausprägung von *tight junctions* zwischen den einzelnen Epithelzellen (Wiener-Kronish et al., 1991).

Der Verlust der epithelialen Integrität in der respiratorischen Insuffizienz hat zur Folge, dass Flüssigkeit in den Alveolarraum übertreten kann, was dort zu einem Ödem führt. Außerdem ist das Epithel für den Rücktransport von Flüssigkeit aus dem Alveolarraum in Richtung des Blutkreislaufes nötig. Durch den Verlust von Epithelzellen durch Apoptose und Nekrose wird somit das empfindliche Gleichgewicht zwischen Flüssigkeitssekretion und -resorption gestört, was zu einer Verlängerung der Gasaustausch-Strecke führt (Modelska et al., 1999; Sznajder, 1999).

Im Modell der intratrachealen LPS-Instillation wird durch die Wirkung des Endotoxins primär eine Schädigung des Epithels hervorgerufen. Durch die Zerstörung der epithelialen Barriere gelangen Zytokine und inflammatorische Mediatoren aus dem Alveolarraum zur Endothelschicht und von dort dann in den Blutkreislauf.

VEGF hat über den Rezeptor Flk-1 eine die Permeabilität steigernde Wirkung. Dies wird hauptsächlich über den MAP Kinasen Signalweg vermittelt (Hillman et al., 2001).

VEGF führt zur Ausprägung vesikulärer Vakuolen in Endothelzellen und kurzfristig zu deren Verschmelzung zu größeren Löchern (Feng et al., 1996; Feng et al., 1999). Weiterhin führt VEGF langfristig zur Ausbildung von Fenestrierungen (Roberts and Palade, 1997) des Endothels. Mittelfristig werden die Verbindungsproteine an den *tight junctions* herunterreguliert, dies konnte für Endothelzellen für VE-cadherin, ZO1 sowie Occludin gezeigt werden (Bates, 2010). Diese Regulation könnte daher auch für Epithelzellen in der Lunge zutreffen, derartige Untersuchungen wurden aber bisher nicht unternommen. Wenn man von einer derartigen Beeinflussung der Verbindungsproteine ausgeht, wäre ein Effekt von VEGF auf die Permeabilität auch bei intratrachealer Gabe nicht verwunderlich. Bei Einsatz der niedrigen Dosis VEGF war der Einfluss auf die Permeabilität nicht steigernd, sondern im Gegenteil reduzierend. Die Alveolen wurden weniger mit proteinreicher Flüssigkeit aus dem Blutgefäßsystem überschwemmt.

Der Grund dafür könnte sein, dass bei einer so niedrigen Dosis die positiven, struktur-erhaltenden Effekte von VEGF (Voelkel et al., 2002) überwiegen. Bei der höheren Dosis

von 10 ng scheinen diese Effekte wieder aufgehoben zu sein. Der permeabilitätssteigernde Effekt von VEGF könnte folglich dosisabhängig auftreten.

Ebenso wirkt die intravenöse Gabe von VEGF auf die Integrität der endothelialen Barriere. In Ratten konnte gezeigt werden, dass die Infusion von VEGF zu einer schnellen Störung der Grenzschicht führt (Tilton et al., 1999).

Der Effekt von VEGF scheint also nicht nur von der verwendeten Dosis, sondern auch von der Art der Applikation abhängig zu sein.

4.6. Zytokine als Inflammationsparameter

Als Vertreter der Zytokine wurden im vorliegenden Versuch sowohl TNF- α als auch MIP-2 in der Lavage-Flüssigkeit bestimmt. Diese zeigten unter LPS-Stimulation den erwarteten Verlauf: Anstieg innerhalb von 24 Stunden, dann rapider Abfall, so dass nach 48 Stunden schon kein erhöhter Wert mehr nachgewiesen werden konnte. Dies deckt sich mit Daten aus der Literatur (Siler et al., 1989).

Die Intervention mit VEGF fand folglich zu dem Zeitpunkt statt, an dem der Zytokinpiegel seinen Höchstwert erreicht hatte. Die Verabreichung von VEGF führte nicht zu einer veränderten Zytokin-Ausschüttung. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den behandelten Gruppen konnten 48 Stunden nach LPS keine erhöhten Spiegel von TNF- α und MIP-2 gemessen werden.

Um eine Regulation im Bereich der Zytokine zu sehen, müsste die Intervention mit VEGF deutlich früher erfolgen. Normalerweise sind die Zytokinwerte bereits nach 4 Stunden massiv erhöht, daher wäre eine VEGF Gabe in diesem Bereich evtl. geeignet um nach 24 Stunden eine Veränderung zu bewirken. Die negativen Folgen einer derart frühen Behandlung sind jedoch nicht absehbar und müssten in einer Folgestudie untersucht werden.

4.7. Intervention mit Wachstumsfaktoren im ARDS

Da das ARDS eine äußerst häufige, schwerwiegende Komplikation bei Intensivpatienten darstellt, wurden schon viele Möglichkeiten der Therapie im Tiermodell entwickelt und am Menschen getestet. Doch spezifische Therapien waren bisher nicht erfolgreich. Zur Unterstützung der Patienten wird ein lungenprotektives Beatmungsregime mit optimalem Flüssigkeitsmanagement kombiniert (2000; Wiedemann et al., 2006). Pharmakologisch

wurde Therapie mit Glukokortikoiden, der Einsatz von N-Acetyl-Cystein und entzündungshemmenden Stoffen sowie exogene Surfactantsubstitution versucht, zeigten aber nur mäßige Erfolge (Hecker et al., 2012). Die Sterblichkeitsrate wurde dadurch nicht verringert.

Wachstumsfaktoren, zu denen auch VEGF zählt, wurden im ARDS bereits vielfach untersucht. Zu nennen sind hier Faktoren wie EGF (*epidermal growth factor*), KGF (*keratinocyte growth factor*) HGF (hepatocyte growth factor), TGF (*transforming growth factor*), PDGF (*platelet derived growth factor*) sowie die TFFs (*trefoil factor family peptides*) (Lindsay, 2011).

TGF- β verhindert die Zellproliferation und reguliert außerdem die Synthese der extrazellulären Matrix. Daher kann die vermehrte Bildung dieses Wachstumsfaktors zu fibrotischen Veränderungen führen. Eine Alternative wäre die Hemmung durch Antikörper oder eine Blockade des Rezeptors, dies wurde jedoch bislang nicht untersucht (Ryan et al., 1994). Fakt ist nur, dass TGF- β eine wichtige Rolle in der Entstehung des ARDS spielt und da auch mit für die Ödem-Bildung verantwortlich ist (Dhainaut et al., 2003).

EGF hingegen wird von alveolären Typ II Epithelzellen gebildet, hier ist es für Reparaturvorgänge essentiell. Es spielt eine Rolle in der Reifung der Pneumozyten (Plopper et al., 1992) und ist somit auch indirekt für die Bildung und Homöostase des alveolären Surfactant von Bedeutung. Die positive Wirkung von EGF als Therapeutikum konnte bisher in *in vitro* Studien gezeigt und im Maus-Modell bestätigt werden (Zgleszewski et al., 1999). Zum Menschen liegen allerdings noch keinerlei Daten vor.

HGF wurde ebenso wie KGF im Alveolarraum von ARDS Patienten gefunden (Stern et al., 2003); es scheint hier Apoptose und Zellproliferation zu regulieren. Als Quelle für diese beiden Wachstumsfaktoren werden neutrophile Granulozyten genannt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass HGF humane Epithelzellen von kleinen Luftwegen *in vitro* vor Apoptose durch TNF- α oder oxidativen Stress schützt (Okada et al., 2004). In vielen Organen weist HGF eine regenerative Wirkung auf (Jiang et al., 1993). Daher wäre die Annahme, dass dies auch für die Lunge der Fall ist, nahe liegend. Doch gibt es keine *in vivo* Daten, die dies belegen können.

Für KGF ist dies jedoch bereits erforscht worden. KGF führt *in vitro* zu vermehrtem Wachstum von alveolären Typ II Epithelzellen und ebenso zu vermehrtem *repair* nach Lungenverletzung (Gillis et al., 1999). In Ratten führt eine Applikation von KGF zu einem

Schutz vor alveolärer Ödembildung bei Reperfusion-Problematiken (Sadovski et al., 2008) sowie vor Hyperoxie-bedingtem Lungenversagen (Panos et al., 1995). Auch für Mäuse konnte eine protektive Wirkung von KGF im Modell der respiratorischen Insuffizienz gezeigt werden (Ulrich et al., 2005). Sowohl bei den Ratten als auch den Mäusen wurde KGF intratracheal eingegeben. Dieser Wachstumsfaktor wäre ein dankbares Mittel zur Therapie beim Menschen, da hier schon ein humaner rekombinanter Stoff verfügbar ist. Daten zur Therapie beim Menschen liegen jedoch auch in diesem Falle bislang nicht vor.

Die Familie der TFFs hat einen anderen Angriffspunkt an den Effektorzellen. Während die meisten anderen Wachstumsfaktoren von basolateral an den Zellen angreifen, wirken diese Peptide von apikal auf die Zellen ein. Daher wären sie für eine Behandlung über den Alveolarraum bestens geeignet. TFFs werden in den Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts, aber ebenso im Respirationstrakt und anderen Organen gebildet. Sie weisen protektive und regenerierende Eigenschaften auf (Hoffmann, 2005). Indem sie einen Prozess initiieren, der als *mucosal restitution* bezeichnet wird, bewirken sie eine Reepithelialisierung von nackten Basalmembranen (Paulsen et al., 2008; Kalabis et al., 2006).

Diese Faktoren wurden bisher jedoch hauptsächlich bei ophthalmologischen und gastrointestinalen Problemen behandelt, ihr potenzieller Wert im ARDS muss noch untersucht werden.

VEGF wurde im Tiermodell bereits erfolgreich zum Schutz vor alveolärem Ödem eingesetzt (Koh et al., 2007), auch hat sich die Blockade des VEGF-Signalweges im ARDS im Tiermodell als vorteilhaft erwiesen (Hamada et al., 2005). Weiterhin ist VEGF für die Integrität der Lunge von essentieller Bedeutung. Aus diesen Gründen wurde VEGF als potentieller Kandidat für die Behandlung des Syndroms in diesem Versuch untersucht. Im Tiermodell hat VEGF eine positive Wirkung auf die Ausprägung des Krankheitsbildes, daher könnte es auch beim Menschen förderlich sein.

Wachstumsfaktoren beschäftigen die Wissenschaft schon lange als mögliche Interventionsmöglichkeiten bei ARDS. Durch die Komplexität dieser Erkrankung und die vielfachen Ursachen wird es wohl schwierig werden, etwas zu finden, das allen Patienten

hilft. Dennoch können Wachstumsfaktoren einen wichtigen Beitrag leisten wenn es um Regeneration, Zellproliferation und verbesserte Parameter bei den Patienten geht.

Jedoch gilt immer, dass die Dosis und die Art der Verabreichung im einzelnen Fall gut erforscht werden müssen, in der Lunge gibt es ja glücklicherweise die Möglichkeit von der Luft-Seite an das Organ heranzugehen, um so systemische Nebeneffekte, die bei Wachstumsfaktoren zu erwarten sind, zu vermeiden.

5. Zusammenfassung

Die respiratorische Insuffizienz ist eine schwerwiegende Komplikation bei Intensivpatienten. Charakteristischerweise tritt bei allen Patienten eine Störung der alveolären Epithel- und Endothelzellschicht auf, gefolgt von einem proteinreichen nicht kardiogenen Lungenödem. Weiterhin kommt es zu einem massiven Einstrom von Leukozyten und letztlich zu einem Lungenversagen.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, der für die strukturelle Integrität der Lunge, insbesondere der Alveolen, verantwortlich ist und außerdem permeabilitätssteigernd wirkt. VEGF spielt außerdem eine Rolle für das Überleben von Zellen sowie für deren Proliferation. Daher wird angenommen, dass es eine wichtige Rolle in der Pathogenese des ARDS spielt. Doch seine Rolle ist bislang nicht abschließend geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Veränderung des endogenen VEGF und seiner Rezeptoren im Modell der LPS-induzierten respiratorischen Insuffizienz untersucht werden, um dann eine Möglichkeit zu finden, dieses Wissen therapeutisch einzusetzen. Im Zeitverlauf ergab sich eine Herunter-Regulation der VEGF und Flk-1 mRNA in alveolären Epithelzellen, nicht jedoch in Endothelzellen. Flt-1 war nicht reguliert.

Nun wurde versucht, mittels intratrachealer Applikation die Tiere 24 Stunden nach LPS-Stimulation mit VEGF zu behandeln. Dies hatte einen positiven Effekt auf viele der gemessenen Parameter. Die Leukozytenanzahl sowohl in der BAL als auch im Lungeninterstitium war deutlich reduziert, ebenso die Ödembildung. Weiterhin wurden scheinbar mehr Monozyten zur Transmigration angeregt, was eine vermehrte Reparatur der Lungenschäden vermuten lässt. Durch die Verwendung zweier Dosierungen von VEGF konnte gezeigt werden, dass die höhere Dosis von 10 ng weniger positive Effekte aufweist als die geringe Dosis von 1 ng. Dies weist auf eine dosis-abhängige Wirkung von VEGF hin.

Ob die Regulation von VEGF mRNA beim Menschen ebenso abläuft, muss noch untersucht werden. Es wurde nachgewiesen, dass eine gering dosierte Applikation von VEGF zu deutlich positiven Effekten auf Zellzahl, Ödembildung und Reparatur im Krankheitsverlauf führt während eine höhere Dosis zur Aufhebung der positiven Effekte führt. Inhalatives VEGF könnte also bei der Behandlung des ARDS beim Menschen einen Beitrag leisten.

6. Summary

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) remains a devastating condition with a high mortality in critically ill patients. Its reasons are manifold, therefore patients show different characteristics. Generally ARDS is characterized by alveolar epithelial and endothelial dysfunction leading to the development of a protein-rich non-cardiogenic pulmonary edema. This is combined with a massive leukocyte invasion and finally acute respiratory failure.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) A is an important growth factor responsible for alveolar structural integrity but also bears a great potential to increase permeability. VEGF also plays a crucial role in cell survival as well as cell proliferation. Therefore it has been considered to play a role in the pathogenesis of ARDS. However, the role of VEGF in ARDS is a matter of on-going discussion.

In this project we wanted to show the alteration of endogenous VEGF in a model of LPS-induced ARDS to find a possibility to use this knowledge for therapeutic purposes. During the injury we observed a downregulation of VEGF and Flk-1 mRNA in alveolar epithelial cells but not in endothelial cells. Flt-1 was not regulated at all.

We tried to intratracheally treat the animals 24 hours after LPS stimulation with VEGF. This had a beneficial effect on many of the parameters monitored. The amount of leukocytes in BAL fluid as well as in the interstitium of the lungs was markedly reduced, just as the edema formation. Furthermore, mononuclear cells migrated into the lungs in larger numbers, indicating augmented repair processes of the injury. By using two dosages of VEGF we were able to show that the higher amount of 10 ng displayed less beneficial effects than the lower dose of 1 ng. This suggests a dose-dependent effect for VEGF.

In this model of ARDS we were able to show that the regulation of VEGF and Flk-1 on mRNA level were primarily in alveolar epithelial cells and not as expected in endothelial cells of the lung vasculature. Whether this is also the case in the human disease needs to be investigated.

Furthermore we demonstrated that a low dose application of VEGF is far better than a higher dosage in regards to number of migrated neutrophils, edema formation and repair.

Inhalative VEGF is therefore a promising agent in the treatment of ARDS in humans.

7. Literaturübersicht

ARDS Network (2000). Ketoconazole for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. The ARDS Network. JAMA 283, 1995-2002.

Abadie,Y., Bregeon,F., Papazian,L., Lange,F., Chailley-Heu,B., Thomas,P., Duvaldestin,P., Adnot,S., Maitre,B., and Delclaux,C. (2005). Decreased VEGF concentration in lung tissue and vascular injury during ARDS. Eur. Respir. J. 25, 139-146.

Akeson,A.L., Cameron,J.E., Le Cras,T.D., Whitsett,J.A., and Greenberg,J.M. (2005). Vascular endothelial growth factor-A induces prenatal neovascularization and alters bronchial development in mice. Pediatr. Res. 57, 82-88.

Akeson,A.L., Greenberg,J.M., Cameron,J.E., Thompson,F.Y., Brooks,S.K., Wiginton,D., and Whitsett,J.A. (2003). Temporal and spatial regulation of VEGF-A controls vascular patterning in the embryonic lung. Dev. Biol. 264, 443-455.

Andonegui,G., Bonder,C.S., Green,F., Mullaly,S.C., Zbytnuik,L., Raharjo,E., and Kubes,P. (2003). Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. J. Clin. Invest 111, 1011-1020.

Asai,K., Kanazawa,H., Kamoi,H., Shiraishi,S., Hirata,K., and Yoshikawa,J. (2003). Increased levels of vascular endothelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients. Clin. Exp. Allergy 33, 595-599.

Ashbaugh,D.G., Bigelow,D.B., Petty,T.L., and Levine,B.E. (2005 online veröffentlicht). Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. The Lancet, Saturday 12 August 1967. Crit Care Resusc. 7, 60-61.

Aukland,K. and Reed,R.K. (1993). Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. Physiol Rev. 73, 1-78.

Bando,H., Brokelmann,M., Toi,M., Alitalo,K., Sleeman,J.P., Sipos,B., Grone,H.J., and Weich,H.A. (2004). Immunodetection and quantification of vascular endothelial growth factor receptor-3 in human malignant tumor tissues. *Int. J. Cancer* 111, 184-191.

Barleon,B., Sozzani,S., Zhou,D., Weich,H.A., Mantovani,A., and Marme,D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87, 3336-3343.

Bates,D.O. (2010). Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc. Res.* 87, 262-271.

Beasley,D., Cohen,R.A., and Levinsky,N.G. (1989). Interleukin 1 inhibits contraction of vascular smooth muscle. *J. Clin. Invest* 83, 331-335.

Beck-Schimmer,B., Schwendener,R., Pasch,T., Reyes,L., Booy,C., and Schimmer,R.C. (2005). Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respir. Res.* 6, 61.

Behzad,A.R., Chu,F., and Walker,D.C. (1996). Fibroblasts are in a position to provide directional information to migrating neutrophils during pneumonia in rabbit lungs. *Microvasc. Res.* 51, 303-316.

Bernard,G.R., Artigas,A., Brigham,K.L., Carlet,J., Falke,K., Hudson,L., Lamy,M., Legall,J.R., Morris,A., and Spragg,R. (1994). The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 149, 818-824.

Bhatt,A.J., Pryhuber,G.S., Huyck,H., Watkins,R.H., Metlay,L.A., and Maniscalco,W.M. (2001). Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 164, 1971-1980.

Bhattacharya,J., Gropper,M.A., and Staub,N.C. (1984). Interstitial fluid pressure gradient measured by micropuncture in excised dog lung. *J. Appl. Physiol* 56, 271-277.

Bone,R.C. (1996). Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med.* 24, 163-172.

Brittan,M., Barr,L., Conway,M.A., Duffin,R., Rossi,F., Johnston,S., Monro,G., Anderson,N., Rossi,A.G., McAuley,D.F., Haslett,C., Hirani,N., Dhaliwal,K., and Simpson,A.J. (2012). A novel subpopulation of monocyte-like cells in the human lung after lipopolysaccharide inhalation. *Eur. Respir. J.* 40, 206-214.

Broekelmann,T.J., Limper,A.H., Colby,T.V., and McDonald,J.A. (1991). Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 6642-6646.

Brown,K.R., England,K.M., Goss,K.L., Snyder,J.M., and Acarregui,M.J. (2001). VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 281, L1001-L1010.

Burns,A.R., Bowden,R.A., MacDonell,S.D., Walker,D.C., Odebunmi,T.O., Donnachie,E.M., Simon,S.I., Entman,M.L., and Smith,C.W. (2000). Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 1), 45-57.

Burns,A.R., Smith,C.W., and Walker,D.C. (2003). Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev.* 83, 309-336.

Burns,A.R., Walker,D.C., Brown,E.S., Thurmon,L.T., Bowden,R.A., Keese,C.R., Simon,S.I., Entman,M.L., and Smith,C.W. (1997). Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J. Immunol.* 159, 2893-2903.

Buttrum,S.M., Drost,E.M., Macnee,W., Goffin,E., Lockwood,C.M., Hatton,R., and Nash,G.B. (1994). Rheological response of neutrophils to different types of stimulation. *J. Appl. Physiol* 77, 1801-1810.

Cardone,M.H., Roy,N., Stennicke,H.R., Salvesen,G.S., Franke,T.F., Stanbridge,E., Frisch,S., and Reed,J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

Carmeliet,P., Ferreira,V., Breier,G., Pollefeyt,S., Kieckens,L., Gertsenstein,M., Fahrig,M., Vandenhoeck,A., Harpal,K., Eberhardt,C., Declercq,C., Pawling,J., Moons,L., Collen,D., Risau,W., and Nagy,A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.

Carmeliet,P., Ng,Y.S., Nuyens,D., Theilmeier,G., Brusselmans,K., Cornelissen,I., Ehler,E., Kakkar,V.V., Stalmans,I., Mattot,V., Perriard,J.C., Dewerchin,M., Flameng,W., Nagy,A., Lupu,F., Moons,L., Collen,D., D'Amore,P.A., and Shima,D.T. (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat. Med.* 5, 495-502.

Clauss,M., Gerlach,M., Gerlach,H., Brett,J., Wang,F., Familletti,P.C., Pan,Y.C., Olander,J.V., Connolly,D.T., and Stern,D. (1990). Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 172, 1535-1545.

Clauss,M., Weich,H., Breier,G., Knies,U., Rockl,W., Waltenberger,J., and Risau,W. (1996). The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 271, 17629-17634.

Cohen,J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885-891.

Compernelle,V., Brusselmans,K., Acker,T., Hoet,P., Tjwa,M., Beck,H., Plaisance,S., Dor,Y., Keshet,E., Lupu,F., Nemery,B., Dewerchin,M., Van,V.P., Plate,K., Moons,L.,

Collen,D., and Carmeliet,P. (2002). Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat. Med.* 8, 702-710.

Corada,M., Mariotti,M., Thurston,G., Smith,K., Kunkel,R., Brockhaus,M., Lampugnani,M.G., Martin-Padura,I., Stoppacciaro,A., Ruco,L., McDonald,D.M., Ward,P.A., and Dejana,E. (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 9815-9820.

Corne,J., Chupp,G., Lee,C.G., Homer,R.J., Zhu,Z., Chen,Q., Ma,B., Du,Y., Roux,F., McArdle,J., Waxman,A.B., and Elias,J.A. (2000). IL-13 stimulates vascular endothelial cell growth factor and protects against hyperoxic acute lung injury. *J. Clin. Invest* 106, 783-791.

da Silva,C.J., Soldau,K., Christen,U., Tobias,P.S., and Ulevitch,R.J. (2001). Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J. Biol. Chem.* 276, 21129-21135.

Damas,P., Reuter,A., Gysen,P., Demonty,J., Lamy,M., and Franchimont,P. (1989). Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med.* 17, 975-978.

Damiano,V.V., Cohen,A., Tsang,A.L., Batra,G., and Petersen,R. (1980). A morphologic study of the influx of neutrophils into dog lung alveoli after lavage with sterile saline. *Am. J. Pathol.* 100, 349-364.

Detmar,M., Brown,L.F., Schon,M.P., Elicker,B.M., Velasco,P., Richard,L., Fukumura,D., Monsky,W., Claffey,K.P., and Jain,R.K. (1998). Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J. Invest Dermatol.* 111, 1-6.

Dhainaut,J.F., Charpentier,J., and Chiche,J.D. (2003). Transforming growth factor-beta: a mediator of cell regulation in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 31, S258-S264.

Doerschuk,C.M., Allard,M.F., Martin,B.A., MacKenzie,A., Autor,A.P., and Hogg,J.C. (1987). Marginated pool of neutrophils in rabbit lungs. *J. Appl. Physiol* 63, 1806-1815.

Doerschuk,C.M., Beyers,N., Coxson,H.O., Wiggs,B., and Hogg,J.C. (1993). Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung. *J. Appl. Physiol* 74, 3040-3045.

Doerschuk,C.M., Downey,G.P., Doherty,D.E., English,D., Gie,R.P., Ohgami,M., Worthen,G.S., Henson,P.M., and Hogg,J.C. (1990a). Leukocyte and platelet margination within microvasculature of rabbit lungs. *J. Appl. Physiol* 68, 1956-1961.

Doerschuk,C.M., Winn,R.K., Coxson,H.O., and Harlan,J.M. (1990b). CD18-dependent and -independent mechanisms of neutrophil emigration in the pulmonary and systemic microcirculation of rabbits. *J. Immunol.* 144, 2327-2333.

Dor,Y., Porat,R., and Keshet,E. (2001). Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 280, C1367-C1374.

Dosch,D.D. and Ballmer-Hofer,K. (2010). Transmembrane domain-mediated orientation of receptor monomers in active VEGFR-2 dimers. *FASEB J.* 24, 32-38.

Downey,G.P., Doherty,D.E., Schwab,B., III, Elson,E.L., Henson,P.M., and Worthen,G.S. (1990). Retention of leukocytes in capillaries: role of cell size and deformability. *J. Appl. Physiol* 69, 1767-1778.

Downey,G.P., Worthen,G.S., Henson,P.M., and Hyde,D.M. (1993). Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147, 168-176.

Doyle,N.A., Bhagwan,S.D., Meek,B.B., Kutkoski,G.J., Steeber,D.A., Tedder,T.F., and Doerschuk,C.M. (1997). Neutrophil margination, sequestration, and emigration in the lungs of L-selectin-deficient mice. *J. Clin. Invest* 99, 526-533.

Ekekezie,I.I., Thibeault,D.W., Rezaiekhaligh,M.H., Norberg,M., Mabry,S., Zhang,X., and Truog,W.E. (2003). Endostatin and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in piglet lungs: effect of inhaled nitric oxide and hyperoxia. *Pediatr. Res.* 53, 440-446.

Esteban,A., Anzueto,A., Frutos,F., Alia,I., Brochard,L., Stewart,T.E., Benito,S., Epstein,S.K., Apezteguia,C., Nightingale,P., Arroliga,A.C., and Tobin,M.J. (2002). Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. *JAMA* 287, 345-355.

Ewan,L.C., Jopling,H.M., Jia,H., Mittar,S., Bagherzadeh,A., Howell,G.J., Walker,J.H., Zachary,I.C., and Ponnambalam,S. (2006). Intrinsic tyrosine kinase activity is required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells. *Traffic.* 7, 1270-1282.

Fakhoury,K.F., Sellers,C., Smith,E.O., Rama,J.A., and Fan,L.L. (2010). Serial measurements of lung function in a cohort of young children with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 125, e1441-e1447.

Farahani,M., Treweeke,A.T., Toh,C.H., Till,K.J., Harris,R.J., Cawley,J.C., Zuzel,M., and Chen,H. (2005). Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells. *Leukemia* 19, 524-530.

Feng,D., Nagy,J.A., Hipp,J., Dvorak,H.F., and Dvorak,A.M. (1996). Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J. Exp. Med.* 183, 1981-1986.

Feng, Y., Venema, V.J., Venema, R.C., Tsai, N., Behzadian, M.A., and Caldwell, R.B. (1999). VEGF-induced permeability increase is mediated by caveolae. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 157-167.

Fenton, M.J. and Golenbock, D.T. (1998). LPS-binding proteins and receptors. *J. Leukoc. Biol.* 64, 25-32.

Ferrara, N. (2002). Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin. Oncol.* 29, 10-14.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.

Filippone, M., Bonetto, G., Cherubin, E., Carraro, S., and Baraldi, E. (2009). Childhood course of lung function in survivors of bronchopulmonary dysplasia. *JAMA* 302, 1418-1420.

Fuh, G., Garcia, K.C., and de Vos, A.M. (2000). The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J. Biol. Chem.* 275, 26690-26695.

Gampel, A., Moss, L., Jones, M.C., Brunton, V., Norman, J.C., and Mellor, H. (2006). VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood* 108, 2624-2631.

Gaudry, M., Bregerie, O., Andrieu, V., El, B.J., Pocidalo, M.A., and Hakim, J. (1997). Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 90, 4153-4161.

Gerber, H.P., Condorelli, F., Park, J., and Ferrara, N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 23659-23667.

Gerber,H.P., Dixit,V., and Ferrara,N. (1998a). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 13313-13316.

Gerber,H.P., Hillan,K.J., Ryan,A.M., Kowalski,J., Keller,G.A., Rangell,L., Wright,B.D., Radtke,F., Aguet,M., and Ferrara,N. (1999a). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126, 1149-1159.

Gerber,H.P., McMurtrey,A., Kowalski,J., Yan,M., Keyt,B.A., Dixit,V., and Ferrara,N. (1998b). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 273, 30336-30343.

Gerber,H.P., Vu,T.H., Ryan,A.M., Kowalski,J., Werb,Z., and Ferrara,N. (1999b). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* 5, 623-628.

Gillis,P., Savla,U., Volpert,O.V., Jimenez,B., Waters,C.M., Panos,R.J., and Bouck,N.P. (1999). Keratinocyte growth factor induces angiogenesis and protects endothelial barrier function. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 12), 2049-2057.

Giri,S.N., Hyde,D.M., and Hollinger,M.A. (1993). Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax* 48, 959-966.

Gong,Y. and Koh,D.R. (2010). Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. *Cell Tissue Res.* 339, 437-448.

Goyert,S.M., Ferrero,E.M., Seremetis,S.V., Winchester,R.J., Silver,J., and Mattison,A.C. (1986). Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens. *J. Immunol.* 137, 3909-3914.

Gropper,M.A., Wiener-Kronish,J.P., and Hashimoto,S. (1994). Acute cardiogenic pulmonary edema. *Clin. Chest Med.* 15, 501-515.

Grunewald,F.S., Prota,A.E., Giese,A., and Ballmer-Hofer,K. (2010). Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 567-580.

Gunther,A., Ruppert,C., Schmidt,R., Markart,P., Grimminger,F., Walmrath,D., and Seeger,W. (2001). Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir. Res.* 2, 353-364.

Hailman,E., Lichenstein,H.S., Wurfel,M.M., Miller,D.S., Johnson,D.A., Kelley,M., Busse,L.A., Zukowski,M.M., and Wright,S.D. (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* 179, 269-277.

Hamada,N., Kuwano,K., Yamada,M., Hagimoto,N., Hiasa,K., Egashira,K., Nakashima,N., Maeyama,T., Yoshimi,M., and Nakanishi,Y. (2005). Anti-vascular endothelial growth factor gene therapy attenuates lung injury and fibrosis in mice. *J. Immunol.* 175, 1224-1231.

Han,S.J., Ko,H.M., Choi,J.H., Seo,K.H., Lee,H.S., Choi,E.K., Choi,I.W., Lee,H.K., and Im,S.Y. (2002). Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J. Biol. Chem.* 277, 44715-44721.

Healy,A.M., Morgenthau,L., Zhu,X., Farber,H.W., and Cardoso,W.V. (2000). VEGF is deposited in the subepithelial matrix at the leading edge of branching airways and stimulates neovascularization in the murine embryonic lung. *Dev. Dyn.* 219, 341-352.

Hecker,M., Weigand,M.A., and Mayer,K. (2012). [Acute respiratory distress syndrome]. *Internist (Berl)* 53, 557-566.

Heinrich,P.C., Castell,J.V., and Andus,T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265, 621-636.

Herold,S., Mayer,K., and Lohmeyer,J. (2011). Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. *Front Immunol.* 2, 65.

Herzog,Y., Kalcheim,C., Kahane,N., Reshef,R., and Neufeld,G. (2001). Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech. Dev.* 109, 115-119.

Hillman,N.J., Whittles,C.E., Pocock,T.M., Williams,B., and Bates,D.O. (2001). Differential effects of vascular endothelial growth factor-C and placental growth factor-1 on the hydraulic conductivity of frog mesenteric capillaries. *J. Vasc. Res.* 38, 176-186.

Hirose,S., Hosoda,Y., Furuya,S., Otsuki,T., and Ikeda,E. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathol. Int.* 50, 472-479.

Hoffmann,W. (2005). Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 2932-2938.

Houck,K.A., Ferrara,N., Winer,J., Cachianes,G., Li,B., and Leung,D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* 5, 1806-1814.

Houck,K.A., Leung,D.W., Rowland,A.M., Winer,J., and Ferrara,N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 267, 26031-26037.

Huang,K., Andersson,C., Roomans,G.M., Ito,N., and Claesson-Welsh,L. (2001). Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 315-324.

Hudson,L.D., Milberg,J.A., Anardi,D., and Maunder,R.J. (1995). Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 151, 293-301.

Jakobsson,L., Kreuger,J., Holmborn,K., Lundin,L., Eriksson,I., Kjellen,L., and Claesson-Welsh,L. (2006). Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Dev. Cell* 10, 625-634.

Jiang,W.G., Hallett,M.B., and Puntis,M.C. (1993). Hepatocyte growth factor/scatter factor, liver regeneration and cancer metastasis. *Br. J. Surg.* 80, 1368-1373.

Kalabis,J., Rosenberg,I., and Podolsky,D.K. (2006). Vangl1 protein acts as a downstream effector of intestinal trefoil factor (ITF)/TFF3 signaling and regulates wound healing of intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.* 281, 6434-6441.

Kanazawa,H., Hirata,K., and Yoshikawa,J. (2002). Involvement of vascular endothelial growth factor in exercise induced bronchoconstriction in asthmatic patients. *Thorax* 57, 885-888.

Kaner,R.J. and Crystal,R.G. (2001). Compartmentalization of vascular endothelial growth factor to the epithelial surface of the human lung. *Mol. Med.* 7, 240-246.

Kaner,R.J., Ladetto,J.V., Singh,R., Fukuda,N., Matthay,M.A., and Crystal,R.G. (2000). Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22, 657-664.

Karkkainen,M.J., Makinen,T., and Alitalo,K. (2002). Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell Biol.* 4, E2-E5.

Karpaliotis,D., Kosmidou,I., Ingenito,E.P., Hong,K., Malhotra,A., Sunday,M.E., and Haley,K.J. (2002). Angiogenic growth factors in the pathophysiology of a murine model of acute lung injury. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 283, L585-L595.

Kasahara,Y., Tuder,R.M., Cool,C.D., Lynch,D.A., Flores,S.C., and Voelkel,N.F. (2001). Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 163, 737-744.

Kasahara,Y., Tuder,R.M., Taraseviciene-Stewart,L., Le Cras,T.D., Abman,S., Hirth,P.K., Waltenberger,J., and Voelkel,N.F. (2000). Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J. Clin. Invest* 106, 1311-1319.

Kaya,A., Ciledag,A., Gulbay,B.E., Poyraz,B.M., Celik,G., Sen,E., Savas,H., and Savas,I. (2004). The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir. Med.* 98, 632-636.

Kendall,R.L. and Thomas,K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10705-10709.

Knudsen,S.T., Bek,T., Poulsen,P.L., Hove,M.N., Rehling,M., and Mogensen,C.E. (2002). Macular edema reflects generalized vascular hyperpermeability in type 2 diabetic patients with retinopathy. *Diabetes Care* 25, 2328-2334.

Kobayashi,S., Sawano,A., Nojima,Y., Shibuya,M., and Maru,Y. (2004). The c-Cbl/CD2AP complex regulates VEGF-induced endocytosis and degradation of Flt-1 (VEGFR-1). *FASEB J.* 18, 929-931.

Koch,S., Tugues,S., Li,X., Gualandi,L., and Claesson-Welsh,L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. J.* 437, 169-183.

Koh,H., Tasaka,S., Hasegawa,N., Asano,K., Kotani,T., Morisaki,H., Takeda,J., Fujishima,S., Matsuda,T., Hashimoto,S., and Ishizaka,A. (2008). Vascular endothelial growth factor in epithelial lining fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. *Respirology.* 13, 281-284.

Koh,H., Tasaka,S., Hasegawa,N., Yamada,W., Shimizu,M., Nakamura,M., Yonemaru,M., Ikeda,E., Adachi,Y., Fujishima,S., Yamaguchi,K., and Ishizaka,A. (2007). Protective role of vascular endothelial growth factor in endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Respir. Res.* 8, 60.

Kreisel,D., Nava,R.G., Li,W., Zinselmeyer,B.H., Wang,B., Lai,J., Pless,R., Gelman,A.E., Krupnick,A.S., and Miller,M.J. (2010). In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 18073-18078.

Labrecque,L., Royal,I., Surprenant,D.S., Patterson,C., Gingras,D., and Beliveau,R. (2003). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol. Biol. Cell* 14, 334-347.

Lahm,T., Crisostomo,P.R., Markel,T.A., Wang,M., Lillemoie,K.D., and Meldrum,D.R. (2007). The critical role of vascular endothelial growth factor in pulmonary vascular remodeling after lung injury. *Shock* 28, 4-14.

Lassus,P., Ristimaki,A., Ylikorkala,O., Viinikka,L., and Andersson,S. (1999). Vascular endothelial growth factor in human preterm lung. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 159, 1429-1433.

Lee,C.G., Link,H., Baluk,P., Homer,R.J., Chapoval,S., Bhandari,V., Kang,M.J., Cohn,L., Kim,Y.K., McDonald,D.M., and Elias,J.A. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat. Med.* 10, 1095-1103.

Lee,Y.C., Kwak,Y.G., and Song,C.H. (2002). Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J. Immunol.* 168, 3595-3600.

Lien,D.C., Henson,P.M., Capen,R.L., Henson,J.E., Hanson,W.L., Wagner,W.W., Jr., and Worthen,G.S. (1991). Neutrophil kinetics in the pulmonary microcirculation during acute inflammation. *Lab Invest* 65, 145-159.

Lindsay,C.D. (2011). Novel therapeutic strategies for acute lung injury induced by lung damaging agents: The potential role of growth factors as treatment options. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 701-724.

Lorquet,S., Berndt,S., Blacher,S., Gengoux,E., Peulen,O., Maquoi,E., Noel,A., Foidart,J.M., Munaut,C., and Pequeux,C. (2010). Soluble forms of VEGF receptor-1 and -2 promote vascular maturation via mural cell recruitment. *FASEB J.* 24, 3782-3795.

Maitre,B., Boussat,S., Jean,D., Gouge,M., Brochard,L., Housset,B., Adnot,S., and Delclaux,C. (2001). Vascular endothelial growth factor synthesis in the acute phase of experimental and clinical lung injury. *Eur. Respir. J.* 18, 100-106.

Martin,T.R., Rubenfeld,G.D., Ruzinski,J.T., Goodman,R.B., Steinberg,K.P., Leturcq,D.J., Moriarty,A.M., Raghu,G., Baughman,R.P., and Hudson,L.D. (1997). Relationship between soluble CD14, lipopolysaccharide binding protein, and the alveolar inflammatory response in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 155, 937-944.

Martin-Padura,I., Lostaglio,S., Schneemann,M., Williams,L., Romano,M., Fruscella,P., Panzeri,C., Stoppacciaro,A., Ruco,L., Villa,A., Simmons,D., and Dejana,E. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* 142, 117-127.

Matthay,M.A. (1990). The adult respiratory distress syndrome. Definition and prognosis. *Clin. Chest Med.* 11, 575-580.

Matute-Bello,G., Frevert,C.W., and Martin,T.R. (2008). Animal models of acute lung injury. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 295, L379-L399.

Modelska,K., Pittet,J.F., Folkesson,H.G., Courtney,B., V, and Matthay,M.A. (1999). Acid-induced lung injury. Protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 160, 1450-1456.

Monacci,W.T., Merrill,M.J., and Oldfield,E.H. (1993). Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am. J. Physiol* 264, C995-1002.

Moore,B.B. and Hogaboam,C.M. (2008). Murine models of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 294, L152-L160.

Muller,W.A. (2001). Migration of leukocytes across endothelial junctions: some concepts and controversies. *Microcirculation.* 8, 181-193.

Murray,J.F. (2010). The structure and function of the lung. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 14, 391-396.

Neufeld,G., Cohen,T., Gengrinovitch,S., and Poltorak,Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13, 9-22.

Nilsson,I., Bahram,F., Li,X., Gualandi,L., Koch,S., Jarvius,M., Soderberg,O., Anisimov,A., Kholova,I., Pytowski,B., Baldwin,M., Yla-Herttuala,S., Alitalo,K., Kreuger,J., and Claesson-Welsh,L. (2010). VEGF receptor 2/3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *EMBO J.* 29, 1377-1388.

Okada,M., Sugita,K., Inukai,T., Goi,K., Kagami,K., Kawasaki,K., and Nakazawa,S. (2004). Hepatocyte growth factor protects small airway epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha or oxidative stress. *Pediatr. Res.* 56, 336-344.

Okusawa,S., Gelfand,J.A., Ikejima,T., Connolly,R.J., and Dinarello,C.A. (1988). Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J. Clin. Invest* 81, 1162-1172.

Ou,X.M., Li,W.C., Liu,D.S., Li,Y.P., Wen,F.Q., Feng,Y.L., Zhang,S.F., Huang,X.Y., Wang,T., Wang,K., Wang,X., and Chen,L. (2009). VEGFR-2 antagonist SU5416 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 9, 70-79.

Panos,R.J., Bak,P.M., Simonet,W.S., Rubin,J.S., and Smith,L.J. (1995). Intratracheal instillation of keratinocyte growth factor decreases hyperoxia-induced mortality in rats. *J. Clin. Invest* 96, 2026-2033.

Park,J.E., Chen,H.H., Winer,J., Houck,K.A., and Ferrara,N. (1994). Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 269, 25646-25654.

Parkos,C.A. (1997). Molecular events in neutrophil transepithelial migration. *Bioessays* 19, 865-873.

Paulsen,F.P., Woon,C.W., Varoga,D., Jansen,A., Garreis,F., Jager,K., Amm,M., Podolsky,D.K., Steven,P., Barker,N.P., and Sel,S. (2008). Intestinal trefoil factor/TFF3 promotes re-epithelialization of corneal wounds. *J. Biol. Chem.* 283, 13418-13427.

Perkins,G.D., Roberts,J., McAuley,D.F., Armstrong,L., Millar,A., Gao,F., and Thickett,D.R. (2005). Regulation of vascular endothelial growth factor bioactivity in patients with acute lung injury. *Thorax* 60, 153-158.

Pittet,J.F., Mackersie,R.C., Martin,T.R., and Matthay,M.A. (1997). Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 155, 1187-1205.

Plopper,C.G., St George,J.A., Read,L.C., Nishio,S.J., Weir,A.J., Edwards,L., Tarantal,A.F., Pinkerton,K.E., Merritt,T.A., Whitsett,J.A., and . (1992). Acceleration of alveolar type II cell differentiation in fetal rhesus monkey lung by administration of EGF. *Am. J. Physiol* 262, L313-L321.

Poynter,M.E., Irvin,C.G., and Janssen-Heininger,Y.M. (2003). A prominent role for airway epithelial NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. *J. Immunol.* 170, 6257-6265.

Pugin,J., Verghese,G., Widmer,M.C., and Matthay,M.A. (1999). The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 27, 304-312.

Ranieri,V.M., Rubenfeld,G.D., Thompson,B.T., Ferguson,N.D., Caldwell,E., Fan,E., Camporota,L., and Slutsky,A.S. (2012). Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 307, 2526-2533.

Roberts,W.G. and Palade,G.E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 6), 2369-2379.

Roberts,W.G. and Palade,G.E. (1997). Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res.* 57, 765-772.

Ryan,R.M., Mineo-Kuhn,M.M., Kramer,C.M., and Finkelstein,J.N. (1994). Growth factors alter neonatal type II alveolar epithelial cell proliferation. *Am. J. Physiol* 266, L17-L22.

Sadovski,J., Kuchenbuch,T., Ruppert,C., Fehrenbach,A., Hirschburger,M., Padberg,W., Gunther,A., Hohlfeld,J.M., Fehrenbach,H., and Grau,V. (2008). Keratinocyte growth factor prevents intra-alveolar oedema in experimental lung isografts. *Eur. Respir. J.* 31, 21-28.

Salikhova,A., Wang,L., Lanahan,A.A., Liu,M., Simons,M., Leenders,W.P., Mukhopadhyay,D., and Horowitz,A. (2008). Vascular endothelial growth factor and semaphorin induce neuropilin-1 endocytosis via separate pathways. *Circ. Res.* 103, e71-e79.

Schenkel,A.R., Mamdouh,Z., Chen,X., Liebman,R.M., and Muller,W.A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol.* 3, 143-150.

Schumann,R.R., Lamping,N., Kirschning,C., Knopf,H.P., Hoess,A., and Herrmann,F. (1994a). Lipopolysaccharide binding protein: its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 80-82.

Schumann,R.R., Rietschel,E.T., and Loppnow,H. (1994b). The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med. Microbiol. Immunol.* 183, 279-297.

Senger,D.R., Galli,S.J., Dvorak,A.M., Perruzzi,C.A., Harvey,V.S., and Dvorak,H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.

Shaw,S.K., Bamba,P.S., Perkins,B.N., and Lusinskas,F.W. (2001). Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J. Immunol.* 167, 2323-2330.

Shibuya,M., Yamaguchi,S., Yamane,A., Ikeda,T., Tojo,A., Matsushime,H., and Sato,M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 5, 519-524.

Shimazu,R., Akashi,S., Ogata,H., Nagai,Y., Fukudome,K., Miyake,K., and Kimoto,M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189, 1777-1782.

Siler,T.M., Swierkosz,J.E., Hyers,T.M., Fowler,A.A., and Webster,R.O. (1989). Immunoreactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome. *Exp. Lung Res.* 15, 881-894.

Singh,A.J., Meyer,R.D., Band,H., and Rahimi,N. (2005). The carboxyl terminus of VEGFR-2 is required for PKC-mediated down-regulation. *Mol. Biol. Cell* 16, 2106-2118.

Skarnes,R.C. (1966). The inactivation of endotoxin after interaction with certain proteins of normal serum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 133, 644-662.

Soker,S., Fidler,H., Neufeld,G., and Klagsbrun,M. (1996). Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* 271, 5761-5767.

Soker,S., Miao,H.Q., Nomi,M., Takashima,S., and Klagsbrun,M. (2002). VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J. Cell Biochem.* 85, 357-368.

Soker,S., Takashima,S., Miao,H.Q., Neufeld,G., and Klagsbrun,M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745.

Song,G., Ouyang,G., and Bao,S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell Mol. Med.* 9, 59-71.

Steinberg,M.S. and McNutt,P.M. (1999). Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 554-560.

Steinmetz,H.T., Herbertz,A., Bertram,M., and Diehl,V. (1995). Increase in interleukin-6 serum level preceding fever in granulocytopenia and correlation with death from sepsis. *J. Infect. Dis.* 171, 225-228.

Stern,J.B., Jaffre,S., Dehoux,M., and Crestani,B. (2003). [Keratinocyte growth factor and Hepatocyte growth factor: their roles in alveolar epithelial repair]. *Rev. Mal Respir.* 20, 896-903.

Stringer,S.E. (2006). The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 451-453.

Sznajder,J.I. (1999). Strategies to increase alveolar epithelial fluid removal in the injured lung. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 160, 1441-1442.

Taichman,N.S., Young,S., Cruchley,A.T., Taylor,P., and Paleolog,E. (1997). Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J. Leukoc. Biol.* 62, 397-400.

Takahashi,T., Ueno,H., and Shibuya,M. (1999). VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 18, 2221-2230.

Terman,B.I., Carrion,M.E., Kovacs,E., Rasmussen,B.A., Eddy,R.L., and Shows,T.B. (1991). Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6, 1677-1683.

Thebaud,B., Ladha,F., Michelakis,E.D., Sawicka,M., Thurston,G., Eaton,F., Hashimoto,K., Harry,G., Haromy,A., Korbitt,G., and Archer,S.L. (2005). Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation* 112, 2477-2486.

Thickett,D.R., Armstrong,L., Christie,S.J., and Millar,A.B. (2001). Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 164, 1601-1605.

Tilton,R.G., Chang,K.C., LeJeune,W.S., Stephan,C.C., Brock,T.A., and Williamson,J.R. (1999). Role for nitric oxide in the hyperpermeability and hemodynamic changes induced by intravenous VEGF. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 689-696.

Tischer,E., Mitchell,R., Hartman,T., Silva,M., Gospodarowicz,D., Fiddes,J.C., and Abraham,J.A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* 266, 11947-11954.

Tobias,P.S., Soldau,K., and Ulevitch,R.J. (1989). Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J. Biol. Chem.* 264, 10867-10871.

Trapnell,B.C. and Whitsett,J.A. (2002). Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu. Rev. Physiol* 64, 775-802.

Tuder,R.M., Groves,B., Badesch,D.B., and Voelkel,N.F. (1994). Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am. J. Pathol.* 144, 275-285.

Tuder,R.M., Zhen,L., Cho,C.Y., Taraseviciene-Stewart,L., Kasahara,Y., Salvemini,D., Voelkel,N.F., and Flores,S.C. (2003). Oxidative stress and apoptosis interact and cause

emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29, 88-97.

Ulrich,K., Stern,M., Goddard,M.E., Williams,J., Zhu,J., Dewar,A., Painter,H.A., Jeffery,P.K., Gill,D.R., Hyde,S.C., Geddes,D.M., Takata,M., and Alton,E.W. (2005). Keratinocyte growth factor therapy in murine oleic acid-induced acute lung injury. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 288, L1179-L1192.

Valdes,G., Erices,R., Chacon,C., and Corthorn,J. (2008). Angiogenic, hyperpermeability and vasodilator network in utero-placental units along pregnancy in the guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 13.

Voelkel,N.F., Cool,C., Taraceviene-Stewart,L., Geraci,M.W., Yeager,M., Bull,T., Kasper,M., and Tuder,R.M. (2002). Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med.* 30, S251-S256.

Walshe,T.E., Dole,V.S., Maharaj,A.S., Patten,I.S., Wagner,D.D., and D'Amore,P.A. (2009). Inhibition of VEGF or TGF- β signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1185-1192.

Waltenberger,J., Claesson-Welsh,L., Siegbahn,A., Shibuya,M., and Heldin,C.H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 269, 26988-26995.

Ware,L.B. and Matthay,M.A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342, 1334-1349.

Weber,C. (2003). Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J. Mol. Med. (Berl)* 81, 4-19.

Whitaker,G.B., Limberg,B.J., and Rosenbaum,J.S. (2001). Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J. Biol. Chem.* 276, 25520-25531.

Wiedemann,H.P., Wheeler,A.P., Bernard,G.R., Thompson,B.T., Hayden,D., deBoisblanc,B., Connors,A.F., Jr., Hite,R.D., and Harabin,A.L. (2006). Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N. Engl. J. Med.* 354, 2564-2575.

Wiener-Kronish,J.P., Albertine,K.H., and Matthay,M.A. (1991). Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin. *J. Clin. Invest* 88, 864-875.

Wolpe,S.D., Sherry,B., Juers,D., Davatelis,G., Yurt,R.W., and Cerami,A. (1989). Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 612-616.

Wright,S.D., Ramos,R.A., Tobias,P.S., Ulevitch,R.J., and Mathison,J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-1433.

Zachary,I. (2001). Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 280, C1375-C1386.

Zgleszewski,S.E., Cilley,R.E., Krummel,T.M., and Chinoy,M.R. (1999). Effects of dexamethasone, growth factors, and tracheal ligation on the development of nitrofen-exposed hypoplastic murine fetal lungs in organ culture. *J. Pediatr. Surg.* 34, 1187-1195.

Zittermann,S.I. and Issekutz,A.C. (2006). Endothelial growth factors VEGF and bFGF differentially enhance monocyte and neutrophil recruitment to inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 80, 247-257.

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Reaktionsgemisch cDNA Synthese	34
Tabelle 2 Reaktionsgemisch <i>Realtime</i> -PCR	34
Tabelle 3 Sequenzen Referenzgene	35
Tabelle 4 Sequenzen Zielgene	35

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der alveolokapillären Barriere im gesunden Organismus.....	3
Abbildung 2 Schematische Darstellung der alveolokapillären Barriere im ARDS	4
Abbildung 3 LPS-Signalkaskade.....	6
Abbildung 4 Die Signalwege von VEGF im adulten Organismus.....	17
Abbildung 5 Versuchsablauf.....	40
Abbildung 6 VEGF mRNA in Endothelzellen.....	43
Abbildung 7 Flt-1 mRNA in Endothelzellen	44
Abbildung 8 Flk-1 mRNA in Endothelzellen.....	44
Abbildung 9 VEGF mRNA in Epithelzellen.....	45
Abbildung 10 Flt-1 mRNA in Epithelzellen	46
Abbildung 11 Flk-1 mRNA in Epithelzellen	46
Abbildung 12 Leukozytenanzahl in der BAL nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.	47
Abbildung 13 Leukozytenanzahl in der BAL nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	48
Abbildung 14 Leukozytendifferenzierung in der BAL nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.	49
Abbildung 15 Leukozytendifferenzierung in der BAL nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	50
Abbildung 16 Leukozytenanzahl im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.....	51
Abbildung 17 Leukozytenanzahl im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	52
Abbildung 18 Leukozytendifferenzierung im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t.....	53
Abbildung 19 Leukozytendifferenzierung im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10	

μg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF.....	54
Abbildung 20 Quantifizierung der interstitiellen und vaskulär-adhärenen Granulozyten im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t.	55
Abbildung 21 Quantifizierung der interstitiellen und vaskulär-adhärenen Granulozyten im Lungenhomogenat nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	56
Abbildung 22 Gesamtproteingehalt in der BAL nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t.	57
Abbildung 23 Gesamtproteingehalt in der BAL nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	58
Abbildung 24 TNF-α Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t.....	59
Abbildung 25 TNF-α Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	60
Abbildung 26 MIP-2 Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t.	61
Abbildung 27 MIP-2 Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	61
Abbildung 28 VEGF-Protein Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t. ...	62
Abbildung 29 VEGF-Protein Spiegel in der BAL nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	63
Abbildung 30 VEGF-Protein Spiegel im Blut nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t.	64
Abbildung 31 VEGF-Protein Spiegel im Blut nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	64
Abbildung 32 Leukozytenanzahl im peripheren Blut nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t.	65
Abbildung 33 Leukozytenanzahl im peripheren Blut nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	66
Abbildung 34 Leukozytendifferenzierung im peripheren Blut nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t.	67
Abbildung 35 Leukozytendifferenzierung im peripheren Blut nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	67
Abbildung 36 Gewichtsverlauf der Mäuse nach Stimulation mit 10 μg LPS i.t. und Behandlung mit VEGF	68
Abbildung 37 Histologie-Schnitte mit H&E-Färbung	70

Versicherung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen habe, 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.

Gießen, 20.03. 2013

Anja Buchbinder

10. Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben und allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

· Mein persönlicher Dank geht an Prof. Dr. Konstantin Mayer, der mir durch die Finanzierung und die Themenstellung die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichte.

· Herrn Prof. Dr. Martin Diener danke ich besonders für die Betreuung im Fachbereich Tiermedizin.

· Weiterhin möchte ich den Prüfern ganz herzlich danken.

· Ferner möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Werner Seeger und Dr. Rory E. Morty für die Aufnahme in das Graduiertenprogramm „Molecular Biology and Medicine of the Lung“ (MBML) bedanken.

· Der Justus-Liebig Universität Gießen danke ich für die dreijährige finanzielle Unterstützung in Form eines Graduiertenstipendiums

· Den Kolleginnen und Kollegen aus meiner Arbeitsgruppe danke ich ebenfalls für eine Atmosphäre, die mich meist gerne zur Arbeit kommen ließ. Allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts danke ich für diverse Hilfestellungen in technischen und administrativen Dingen.

· Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Geduld Studium und Dissertation anders verlaufen wären. Ohne Euch hätte ich so manches wohl nicht so gut bewerkstelligt!

· Meinem Mann Benno Grzesik möchte ich danken für die jahrelange Unterstützung, für sein Engagement bei fachlichen und sonstigen Problemen, seine unendliche Geduld und die Korrekturarbeiten an dieser Arbeit. Ohne Dich hätte ich es niemals geschafft!



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: 978-3-8359-6123-4



9 783835 1961234