

Rolle der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38 und
ERK1/2 bei der Regulation der Zyklooxygenase-2- und
Thromboxansynthase in unstimulierten und LPS-stimulierten isoliert
perfundierten Rattenlungen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Daniel Kuttner
aus Giessen

Giessen 2009

Aus dem medizinischen Zentrum für Pathologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Roland Moll

Gutachter: Prof. Dr. med. Ermert

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Grau

Tag der Disputation: 26.10.2010

	Abkürzungsverzeichnis	4
1	Signaltransduktion des Lipopolysaccharids (Endotoxin) und Rolle der MAP-Kinasen	5
1.1	LPS, Sepsis und ARDS	5
1.2	„Priming“ durch LPS und zugrundeliegende Arbeitshypothese	7
1.3	Arachidonsäuremetabolismus	9
1.4	LPS-Rezeptorstrukturen	10
1.4.1	Toll-like-Rezeptoren, LPS-Rezeptorkomplex, transmembranöse Signaltransduktion und CD14-unabhängige Rezeptorinteraktion.....	11
1.5	Intrazelluläre Signaltransduktion: MyD88-abhängige und -unabhängige Zellaktivierung	12
1.6	MAP-Kinasen und NFκB	13
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen	19
2	Material	20
2.1	Experimentelle Agenzien und Pharmaka	20
3	Methoden	20
3.1	Das Modell der isolierten Rattenlunge.....	20
3.1.1	Einführung.....	20
3.1.2	Aufbau des Arbeitsplatzes.....	21
3.1.3	Versuchsvorbereitung.....	24
3.1.4	Präparation	24
3.1.5	Integration in das Meßsystem	25

3.1.6	Versuchsende	26
3.2	Versuchsgruppen	27
3.2.1	Perfusatproben.....	28
3.2.2	Detailbeschreibung der verwendeten MAPK-Inhibitoren.....	28
3.3	ELISA-Messung.....	30
3.4	Statistik.....	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Kontrollexperimente mit und ohne LPS-Stimulation (ohne MAPK- Inhibitorzugabe)	31
4.1.1	Veränderung der pathophysiologischen Parameter in LPS- stimulierten und unstimulierten Rattenlungen.....	31
4.1.2	Veränderung der Prostanoidliberation in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen.....	32
4.2	Die p38-Inhibitoren SB 203580 und SC 68376	33
4.2.1	Beeinflussung der pathophysiologischen Parameter in LPS- stimulierten und unstimulierten Rattenlungen durch p38-Inhibition .	33
4.2.2	Beeinflussung der Prostanoidliberation in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen durch p38-Inhibition.....	35
4.3	Der MEK1/2-Inhibitor U 0126.....	38
4.3.1	Beeinflussung der pathophysiologischen Parameter in LPS- stimulierten und unstimulierten Rattenlungen durch MEK1/2- Inhibition	38
4.3.2	Beeinflussung der Prostanoidliberation in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen durch MEK1/2-Inhibition.....	40

5	Diskussion	42
5.1	Diskussion der Ergebnisse der Kontrollexperimente mit und ohne LPS-Stimulation	42
5.2	Diskussion der Ergebnisse der p38-Inhibition	45
5.3	Diskussion der Ergebnisse der ERK-Inhibition	47
5.4	Zusammenfassung	50
5.5	Summary	51
6	Literaturverzeichnis.....	52
7	Anhang	69
7.1	Diagramme	69
7.2	Experimentelle Agenzien und Pharmaka	73
7.3	Hilfsmittel und Geräte	74
8	Publikationsverzeichnis	75
9	Danksagung.....	76

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AP-1	Aktivatorprotein 1
ARDS	„acute respiratory distress syndrome“
CD14	CD14-Rezeptor („cluster of differentiation 14“)
mCD14	membrangebundener CD14-Rezeptor („membrane cluster of differentiation 14“)
sCD14	löslicher CD14-Rezeptor („soluble cluster of differentiation 14“)
Cox-1/2	Zyklooxygenase 1/2
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	„enzym linked immuno sorbent essay“
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
Il-1	Interleukin-1
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MD-2	„myeloid differentiation 2“
NF- κ B	nukleärer Faktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
iNOS	induzierbare NO-Synthase
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAP	pulmonalarterieller Druck
6-keto PGF _{1α}	6-keto Prostaglandin F _{1-alpha}
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostazyklin
PVP	pulmonalvenöser Druck
SEM	Standardfehler
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TxA ₂	Thromboxan A ₂
TxB ₂	Thromboxan B ₂
VP	Ventilationsdruck
W	Gewicht

1 Signaltransduktion des Lipopolysaccharids (Endotoxin) und Rolle der MAPK

1.1 LPS, Sepsis und ARDS

Das Verständnis der Pathogenese von infektiösen Erkrankungen ist die Grundlage bei der Entwicklung und Etablierung neuer therapeutischer Strategien. Besonderes Augenmerk gilt trotz zunehmender hygienischer Prävention den Infektionen mit gramnegativen Bakterien, die vorzugsweise das Keimspektrum hospitalisierter Patienten darstellen, und deren septischer Komplikationen. Der Schweregrad der Infektion mit fakultativer septischer Eskalation und des sepsis-assoziierten Multiorganversagens durch gramnegative Erreger wird unter anderem vom Ausmaß der begleitenden Endotoxämie und der konsekutiven Wirtsreaktion mitbestimmt. Die pathologischen Korrelate hierfür sind - in variabler Ausprägung - Hyper- oder Hypothermie, erhöhte endotheliale Permeabilität, Hyperreagibilität der Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen und eine Induktion prokoagulatorischer Effekte am Endothel mit Ausbildung von Mikrothromben, konsekutiven Mikrozirkulationsstörungen und funktionellen arteriovenösen Gefäßshunts (Opal, 2007). Insbesondere die Entstehung des akuten Lungenversagens (ARDS) in 20-50 % bei Sepsis, oftmals im Rahmen einer parapneumonischen Genese, mit konsekutiver arterieller Hypoxämie und maschineller Überdruckbeatmung stellt für den Patienten eine lebensbedrohliche Aggravation dar und ist mit einer hohen Letalität von 50-70 % verbunden (Fauci et Longo, 2008). Die Erforschung der grundlegenden pathophysiologischen und zellulären Mechanismen der endotoxin-induzierten Regulationsphänomene dient der Entwicklung neuer therapeutischer Optionen zur frühen Intervention bei Sepsis und ARDS.

Die beiden Begriffe „Lipopolysaccharid“ (LPS) und „Endotoxin“ stehen synonym für ein aus drei Untereinheiten - Lipid A, Kernpolysaccharid, O-Antigen – bestehendes Molekül mit amphiphilem Charakter, das als integrale Hauptkomponente der Außenseite der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien eine essentielle Funktion in der Permeabilitätsregulation des Einzellers besitzt (Yethon et Whitfield, 2001; Fauci et longo 2008). „Endotoxin“ impliziert zwar eine unmittelbare Wirtsschädigung, die pathogene Wirkung entfalten es aber nicht durch einen direkten toxischen Effekt. Vielmehr fungiert es als Entzündungsinduktor, denn die eigentliche Schädigung entsteht durch die wirtseigene inflammatorische Reaktion (Opal, 2007). Das hydrophobe Lipid A ist für die meisten pathophysiologischen Wirkungen des LPS verantwortlich. Es setzt sich aus einer Diglucosamingruppe, an die Fettsäuren in Ester- und Amidbindungen angeordnet sind,

zusammen und stellt die integrale Verbindung mit der äußeren Membran her. Der Begriff „Endotoxin“ hat sich für das gesamte LPS-Molekül etabliert, die eigentliche wirtsinduzierte Toxizität vermittelt aber vor allem das Lipid A und dessen Interaktion mit wirtseigenen Rezeptorsystemen (Rietschel et al., 1987). Das Kernpolysaccharid (Core-) besteht aus zwei Untereinheiten: der äußere Teil baut sich aus Galaktose und N-Acetyl-Glucosamin auf, das innere Kernpolysaccharid enthält als Besonderheit eine spezifische Zuckersäure, die 2-Keto-3-desoxy-octonsäure, die mit dem Lipid A verbunden ist (Raetz et al., 1991).

Die hydrophilen O-Antigene bestehen meist aus drei bis maximal 20 Hexosemolekülen in häufig repetitiven Mustern und weisen für Bakterienspezies eine spezifische Individualstruktur auf, die, wie im Falle der Salmonellen, der Taxonomie der Serovare dient (Raetz et al., 1991). O-Antigene induzieren beim Menschen hochspezifische Antikörper. Während das O-Antigen innerhalb einer Bakterienspezies hochvariabel in der Zusammensetzung seiner Zucker ist und auch das Kernpolysaccharid eine gewisse Heterogenität besitzt, ist das Lipid A bei Enterobakteriazen und anderen gramnegativen Bakterien weitgehend identisch.

Zur Freisetzung von Endotoxinen kommt es durch Destruktion der Bakterienzelle im Rahmen der Immunantwort und/oder antimikrobieller Therapie oder durch Abgabe von Membranvesikeln durch lebende Bakterien. Die Exposition des Wirtsorganismus gegenüber Lipopolysaccharid bewirkt die rezeptorvermittelte Liberation unterschiedlichster pro- und antiinflammatorischer Mediatoren und Zytokine (Tumor-Nekrose-Faktor alpha [TNF- α], pro- und antiinflammatorischer Interleukine, Akut-Phase-Proteine, Zelladhäsionsmoleküle, plättchenaktivierender Faktor [PAF], Stickstoffmonoxid [NO], Endothelin, Prostanoid, Komplement, Kinine, etc.) durch Rekrutierung zellulärer Depots und Induktion transkriptioneller Mechanismen (Fauci et Longo, 2008). Es resultiert eine in ihrer Dimension unter Umständen überschießende Wirtsantwort, die unter anderem von der Schwere der Infektion und dem Ausmaß der Endotoxinämie abhängig ist, mit folgender Aktivierung unterschiedlichster Effektorsysteme. Insbesondere das Vorliegen schwerer gramnegativer und grampositiver Mischinfektionen stellt eine nochmalige Aggravation des Krankheitsbildes dar, wobei grampositive Exotoxine zusätzliche mikrobielle Stimuli für die endotoxinvermittelten charakteristischen Veränderungen der zellulären Immunantwort zu sein scheinen (Fauci et Longo, 2008). Das Vollbild stellen letztlich der septische Schock und das komplikative ARDS mit oftmals letalem Ausgang dar. Große Anstrengungen werden derzeit insbesondere in der pharmakologischen Forschung unternommen, um auf therapeutischem Wege die wirtsschädigenden LPS-Effekte günstig zu beeinflussen.

1.2.1 „Priming“ durch LPS und zugrundeliegende Arbeitshypothese

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass eine Vorbehandlung intakter, explantierter, artifiziell ventilierter und perfundierter Rattenlungen mit LPS in einer Dosierung, die per se keine Veränderung physiologischer Parameter zur Folge hat, nach Applikation eines sekundären inflammatorischen oder mikrobiellen Stimulus in einer erhöhten Reaktivität der gemessenen veränderlichen Größen resultiert. Diese durch LPS vermittelte gesteigerte Reagibilität nach Gabe von bakteriellen Exotoxinen (z.B. Hämolysin von *Escherichia coli* oder Alpha-Toxin von *Staphylococcus aureus*) als zusätzlichen mikrobiellen Stimulus, welche die Rekrutierung von Arachidonsäure (AA) aus den Zellmembrandepots des Wirtsorganismus vermitteln (Seeger et al., 1984; Schütte et al., 1997; Sibelius et al., 2000), oder nach direkter Applikation von Arachidonsäure in den intravasalen Raum äußert sich in einer vielfach gesteigerten pulmonalarteriellen Druckerhöhung, einem Anstieg des Ventilationsdruckes, einer Ventilations-Perfusions-Fehlverteilung sowie einer pulmonalvaskulären, evtl. auch einer alveoepithelialen Schrankenstörung mit Ödembildung (Walmrath et al., 1994). Diesem „Priming“-Phänomen liegen verschiedene Arbeitshypothesen zugrunde. Das Zusammenspiel folgender Mechanismen stellt das Korrelat für das zuvor Beschriebene dar:

1. Die Vorbehandlung der Lungen mit LPS induziert eine vermehrte Expression der Zyklooxygenase (COX)-2 und Thromboxan-Synthase über rezeptorvermittelte intrazelluläre enzymatische Signaltransduktionskaskaden. Die kompensatorische Aktivierung der PGI₂-Synthase (COX-1 vermittelt) unterbleibt bzw. ist im Vergleich weniger ausgeprägt. Der sekundäre Stimulus (Hämolysin bzw. Arachidonsäure) führt zu einer überschießenden Thromboxanliberation mit folgender Vasokonstriktion.
2. Die Vorbehandlung der Lungen mit LPS bewirkt eine Vasodilatation durch Hochregulation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) bei Herabregulation der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Hieraus folgt eine Ventilations-Perfusions-Verteilungsstörung nach Applikation mit einem sekundären Stimulus (Ermert et al., 2002).

3. Die Vorbehandlung der Lungen mit LPS triggert eine durch die Liberation von proinflammatorischen Cytokinen (TNF- α , Interleukin [IL]-1) und Hochregulation ihrer Rezeptoren induzierte Zunahme der Reaktionsbereitschaft der Zielzellen mit konsekutiver kapillarendothelialer und alveoepithelialer Permeabilitätserhöhung nach Provokation mit einem sekundären Stimulus.

Es konnte in immunhistochemischen Untersuchungen wie auch in Versuchen am Organmodell gezeigt werden, dass dem „Priming“-Phänomen in einem wahrscheinlich multifaktoriellen Zusammenspiel verschiedener Regulationsmechanismen als wichtiger Aspekt die Hochregulation der Cox-2 und Thromboxan-Synthase mit konsekutiver Liberation vasoaktiver Prostanoiden (zyklooxygenase-abhängige Arachidonsäuremetabolite) zugrunde liegt (Ermert et al., 2000c; Ermert et al., 2000b). Diese Arbeit soll insbesondere der Frage der intrazellulären Signaltransduktion des LPS mit folgender transkriptioneller Aktivierung des Zyklooxygenase-Effektorsystems („Priming“) nach rezeptorvermittelter transmembranöser Signalverarbeitung nachgehen. Hierbei spielen eine Vielzahl von Regulationsmechanismen und regulatorischen Enzymkaskaden eine immense Rolle, wobei im besonderen Interesse dieser Studie die Aktivierung der Cox-2/Thromboxan-Synthase-Achse mittels der zytoplasmatischen Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) als mögliche Schlüsselenzyme der transkriptionellen Steuerung der inflammatorischen Wirtsantwort stehen. Im folgenden soll der Arachidonsäuremetabolismus und die Signaltransduktionskaskade des LPS dargelegt werden.

1.3 Arachidonsäuremetabolismus

Arachidonsäuremetaboliten sind seit langem als Lipidmediatoren bekannt, die wesentlich an der Veränderung der pulmonalen physiologischen und pathophysiologischen Parameter (Gefäß- und Bronchustonusveränderungen, Gefäß- und Alveolarepithelpermeabilität) beteiligt sind (Malik et al., 1985; Holtzman, 1991). Die gesteigerte Rekrutierung und Verstoffwechslung freier AA - entweder aus dem Membranpool gefäßassoziiertes Zellen freigesetzt oder aus dem intravaskulären Raum angeboten - führt zu einer maßgeblich thromboxan-vermittelten Vasokonstriktion (Seeger et al., 1986; Selig et al., 1986), einem Ventilations-Perfusions-Mismatch (Walmrath et al., 1993) und zu Änderungen der mikrovaskulären Drücke und der Gefäßpermeabilität (Seeger et al., 1986; Townsley et al., 1985a). Die Konversion der AA zu den klassischen Prostaglandinen (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$) und den Prostanoiden Thromboxan A_2 (TXA_2) und Prostazyklin (PGI_2) wird mittels der Zyklooxygenase-Isoenzyme 1 und 2 (Prostaglandin-H-Synthetase) initiiert, die die Bildung der kurzlebigen Endoperoxide PGG_2 und PGH_2 katalysieren. PGH_2 ist Substrat der verschiedenen Isomerasen, Reduktasen und Synthetasen, die die einzelnen Prostanotide bilden. Der funktionelle Antagonismus des vaso- und bronchokonstriktorisches TxA_2 und des vasodilatatorischen PGI_2 stellt in der Steuerung und Aufrechterhaltung der pulmonalen veränderlichen Größen einen wichtigen Regulationsmechanismus dar. $\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGD_2 sollen eine starke bronchokonstriktorisches Potenz in den glatten Muskelzellen der Atemwege besitzen, $\text{PGF}_{2\alpha}$ zudem pulmonal vasokonstringieren (Seibert et al., 1987). PGE_2 ist ein starker Vasokonstriktor und Bronchodilatator und beeinflusst Sekretliberation und proliferative Prozesse (Pentland et al., 1986; Townsley et al., 1985b).

Die Cox-1 wurde als ubiquitär exprimiertes Isoenzym charakterisiert (DeWitt, 1991; Goppelt-Struebe, 1995), dessen konstitutives Vorliegen mit konsekutiver Prostanoidliberation in vielen Geweben eine Vielzahl physiologischer Funktionen wie Regulation des Vaso- und Bronchustonus, Integrität der gastralen mukosalen Barriere, Homöostase der Nierenfunktion und des Flüssigkeitshaushaltes, etc. erfüllt (DeWitt, 1991; Klein et al., 1994; Goppelt-Struebe, 1995). Die Cox-2 hingegen sollte zunächst vor allem oder ausschließlich als unter entzündlichen Bedingungen induzierbar gelten (Lee S.H. et al., 1992; Feng et al., 1993; Hempel et al., 1994). In nicht inflammatorisch stimulierten Rattenlungen jedoch konnte in immunhistochemischen Studien eine konstitutive Expression beider Zyklooxygenase-Isoenzyme (Cox-1 und -2) gezeigt werden, wobei Cox-1 prädominant in Bronchialepithelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen der großen Pulmonalvenen,

Alveolarmakrophagen und arteriellen Endothelzellen nachgewiesen werden konnte. Cox-2 hingegen wird unter physiologischen Bedingungen vor allem in peribronchialen und perivaskulären Makrophagen und mastzellähnlichen Zellen und ausgeprägt in glatten Gefäßmuskelzellen der pulmonalen Widerstandsgefäße gefunden (Ermert et al., 1998b). Nach AA-Exposition inflammatorisch unstimulierter Rattenlungen scheint die Cox-2 eine tragende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus zu spielen, da eine pulmonale Vasokonstriktion mit selektiven Cox-2-Inhibitoren unterdrückt werden konnte (Ermert et al., 1998a). In mit LPS stimulierten Rattenlungen löste die AA-Exposition eine überschießende vaskuläre Druckantwort einhergehend mit einem Anstieg des Ventilationsdrucks und Ausbildung eines massiven Lungenödems als Korrelat der Thromboxanliberation aus. Diese Antwort auf einen sekundären inflammatorischen Stimulus (AA) ist maßgeblich durch eine Hochregulation der Cox-2 und Thromboxan-Synthase verursacht und es liegt eine weitgehende Koexpression der beiden Enzyme hinsichtlich der Verteilung im Lungengewebe vor, wohingegen die Expression der Cox-1 von der LPS-Stimulation völlig unberührt bleibt. In Korrelation hierzu konnte die Bildung des vasodilatatorischen PGI₂ nicht durch selektive Cox-2-Inhibitoren vermindert werden, was eine maßgebliche Regulation der PGI₂-Synthese via Cox-1 nahe legt (Ermert et al., 2000c; Ermert et al., 2000a).

1.4 LPS-Rezeptorstrukturen

Vorausgegangene Arbeiten haben gezeigt, dass bei der Erkennung des LPS durch die Wirtszelle als Rezeptorstruktur das Glykoprotein „cluster of differentiation 14“ (CD14) von wesentlicher Bedeutung ist (Rietschel et al., 1998; Zhang und Gosh, 2000). Die Bindung des LPS an CD14 erfordert die vorherige Bildung eines katalytischen Proteinkomplexes mit dem LPS-bindenden Protein (LBP) (Wright et al., 1990; Pugin et al., 1993). CD14 kann entweder an der Zelloberfläche (mCD14) als 54 kDa großes glycophosphatidylinositol-verankertes membrangebundenes Protein ohne cytoplasmatische Signaltransduktionsdomäne vorkommen oder in einer löslichen Form (sCD14) ohne Glykolipidanker vorliegen (Da Silva Correia et al., 2001). Eine ausgeprägte Expression von CD14-Rezeptoren findet sich u.a. in den Zellmembranen von Makrophagen, Granulozyten und Monozyten. Insbesondere humane Endothelzellen und ausgesuchte Epithelzellen verfügen über keine CD14-Expression (Pugin et al., 1993). In immunhistochemischen Untersuchungen der Rattenlunge konnte gezeigt werden, dass mCD14-Rezeptoren in einer Vielzahl von pulmonalen Zielzellen exprimiert

werden, so u.a. in Bronchialepithelzellen, Alveolarmakrophagen, perivaskulären Leukozyten und glatten Gefäßmuskelzellen, wohingegen in Epithelzellen der kleinen Bronchiolen, glatten Muskelzellen der Bronchien, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen der Arterien keine Expression von CD14-Rezeptoren vorliegt (Ermert et al., 2000b). Eine Vermittlung der Signaltransduktion zur Zielzelle bei Defizienz des mCD14-Rezeptors erfolgt dann über sCD14 (Pugin et al., 1993), welches mit LPS und LBP membranunabhängig bindet. Die Bindung von LPS an CD14 und die nachfolgende Zellaktivierung kann durch Antikörper gegen CD14 blockiert werden (Wright et al., 1990; Leturcq et al., 1996) und ist in CD14 „knock-out“ Mäusen deutlich vermindert (Haziot et al., 1996). Es existieren auch LBP- und CD14-unabhängige LPS-Signalübertragungswege zur Zielzelle. CD55 und die β -Integrine CD11b/CD18 und CD11c spielen in diesem Zusammenhang eine Rolle (Wright, 1991; El Samalouti et al., 1999; Ingalls et al., 1997). Zudem könnten noch andere Moleküle wie z.B. Hitze-Schock-Proteine (Hsp70 und 90), Chemokine-Rezeptor-4 (CXCR4) und Growth differentiation factor 5 (GDF5) an einer CD14-unabhängige Signalvermittlung beteiligt sein (Triantafilou et al., 2002). Der CD14-Rezeptor darf aber als ein integraler Bestandteil der LPS-induzierten Transduktionsphänomene betrachtet werden. Da er aber über keine intrazelluläre Signaltransduktionsdomäne verfügt, ist er nicht zur transmembranösen Signalvermittlung fähig.

1.4.1 Toll-like-Rezeptoren, LPS-Rezeptorkomplex, transmembranöse Signaltransduktion und CD14-unabhängige Rezeptorinteraktion

Nach heutigem Kenntnisstand kann davon ausgegangen werden, dass der CD14-Rezeptor nur einen Teil eines Rezeptorkomplexes zur Erkennung und Signalverarbeitung des LPS repräsentiert. Weitere wesentliche Bestandteile dieses Komplexes sind Rezeptoren aus der Gruppe der Toll-like-Rezeptoren (TLR) und der 1999 detektierte Rezeptor „myeloid differentiation protein-2“ (MD-2) (Shimazu et al., 1999). Toll-Rezeptoren wurden als integraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) charakterisiert. TLR sind den Toll-Rezeptoren der Taufliege in Struktur und Funktion ähnliche Transmembranproteine. Sie besitzen eine extrazelluläre Domäne mit leucinreichen Aminosäuresequenzen sowie eine cytoplasmatische Domäne, die dem intrazellulären Anteil des Typ 1 Il-1-Rezeptors ähnlich ist (Toll/Il-1-Domäne [TIR]) und aktivieren in Analogie zu Il-1 „nuclear factor kappa B“ (NF κ B) (Schwandner et al., 1999;

Yang et al., 2000). Bis heute sind 10 verschiedene humane TLR (TLR 1-10) beschrieben worden (Pandey und Agrawal, 2006.), wobei insbesondere TLR-2 und -4 eine besondere Rolle in der Erkennung bakterieller Agenzien spielen sollen. TLR-4 fungiert dabei als Teil des Rezeptorkomplexes für Lipopolysaccharide, dessen funktionelle Integrität vom Vorhandensein von mindestens drei Proteinen – CD14, TLR-4 und MD-2 – abhängt. (Da Silva Correia und Ulevitch, 2002). LPS wird hierbei vom CD14-Rezeptor erkannt und dem TLR-4/MD-2-Komplex präsentiert (Da Silva Correia et al., 2001). Es bindet an jede Komponente des LPS-Rezeptorkomplexes mit konsekutiver intrazellulärer Signaltransduktion, wobei erst MD-2 dem TLR-4 die Bindung des LPS und die Formation eines stabilen Rezeptorkomplexes ermöglicht (Visintin et al., 2003). Weiterhin scheint die Anzahl der TLR-4-Moleküle, die am Rezeptorcluster teilnehmen, variabel zu sein und eine tragende Rolle in der Ausprägung der Rezeptorantwort zu spielen (Triantafilou et al., 2004). TLR-4 stellt den transmembranösen Teil des Komplexes. Das sogenannte LPS-Gen, welches in ausgewählten Mäusestämmen für die fehlende inflammatorische Antwort auf LPS-Exposition verantwortlich gemacht wurde, ist als das den TLR-4 Rezeptor kodierende Gen identifiziert worden (Hoshino et al., 1999; Qureshi et al., 1999). Mutationen der Sequenzen des menschlichen TLR-4-Gens, die für die extrazelluläre Domäne des Rezeptors kodieren, führen ebenfalls zur Hyposensibilität gegenüber LPS (Arbour et al., 2000). TLR-2 hingegen diskriminiert neben LPS spezifische Peptidoglycane und Lipoteichonsäure als Stoffwechselprodukte grampositiver Bakterien (Schwandner et al., 1999; Ulevitch, 2003; Da Silva Correia et al., 2001).

1.5 Intrazelluläre Signaltransduktion: MyD88-abhängige und -unabhängige Zellaktivierung

In den letzten Jahren erfolgte eine substantielle Erweiterung des Wissens, welche Signalmechanismen für die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren durch LPS rekrutiert werden, wobei in der transkriptionellen Endstrecke insbesondere NF κ B eine tragende Rolle spielt. Wie zuvor beschrieben ist TLR-4 der primäre transmembranöse Signalvermittler für LPS. Nach der CD14- und MD-2-vermittelten Bindung des LPS an TLR-4 erfährt dieser eine konformationale Änderung seiner cytoplasmatischen Domäne (Toll/IL-1-Domäne [TIR]) und bindet die Adapterproteine MyD88 und TIRAP (TIR-domain-containing adaptor molecules). Während dieser MyD88-abhängige Signaltransduktionsmechanismus

maßgeblich die Liberation inflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6 über die Aktivierung der MAPK und $\text{NF}\kappa\text{B}$ kontrolliert, existiert ein MyD88-unabhängiger Signalweg, der nicht zur Freisetzung besagter Zytokine führt, sondern eine verminderte Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ und MAPK durch LPS-Stimulation zeigt (Kawai et al., 1999) und vor allem die vermehrte Expression von Interferon-induzierbaren Genen durch Aktivierung des maßgeblichen Transkriptionsfaktors (IFN regulatory factor 3 [IRF3]) vermittelt (Kawai et al., 2001; Dauphinee und Karsan, 2006). Im MyD88-abhängigen Signalweg interagiert MyD88 mit der IL-1R -assoziierten Kinase (IRAK)-4. IRAK-4-defiziente Mäuse besitzen eine stark eingeschränkte TLR-4-vermittelte Signalantwort mit folglich verminderter $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung (Suzuki et al., 2002). Die Bindung von IRAK-4 an den Rezeptorkomplex ermöglicht die Transphosphorylierung und Aktivierung von IRAK-1. Hieraus resultiert die Fähigkeit von IRAK-1, den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor-6 (TRAF-6) zu binden und zu aktivieren. Dies führt über verschiedene Zwischenschritte (TAK1 [transforming growth factor- β -activated kinase 1] und den Adaptormolekülen TAB- [TAK-1-binding protein] 1, 2 und -3) zur „Downstream“-Aktivierung des $\text{I}\kappa\text{B}$ (inhibitor of $\text{NF}\kappa\text{B}$)-Kinasekomplexes (IKK), der eine Schlüsselfunktion in der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Regulation einnimmt, und der MAPK (Dauphinee und Karsan, 2006; Zhang und Gosh, 2000).

1.6 MAP-Kinasen und $\text{NF}\kappa\text{B}$

In Säugetieren existieren drei verschiedene MAPK-Signaltransduktionswege: die Extrazellulär Signal-regulierte Kinase-Kaskade (ERK), die p38 MAPK-Kaskade und die c-Jun NH_2 -terminal kinases- (JNK/SAPK [Stress-aktivierte-Protein-Kinase]-) Kaskade. MAPK sind an einer Vielzahl zellulärer Funktionen wie Zellwachstum und -differenzierung, Kanzerogenese, Apoptose, Reaktionen auf inflammatorischen Stress, etc. beteiligt. Sie reagieren auf eine große Bandbreite von Veränderungen im extra- und intrazellulären Milieu und übersetzen diese Veränderungen in eine modifizierte Regulation der Zellfunktion und Genexpression. Sie kooperieren dabei mit vielen alternativen Signaltransduktionswegen.

Die JNK/SAPK- und p38-Kaskade regulieren maßgeblich die durch inflammatorische Zytokine ausgelöste zelluläre Stressreaktion und die Apoptose (Zhang et al., 2005). p38 existiert in 4 Isoformen (α , β , γ und δ), wobei insbesondere p38 α und p38 β in der Vermittlung inflammatorischer Stimuli und Antworten des angeborenen Immunsystems eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen (Ulevitch, 2003). Die p38-MAPK rückte in jüngster

Zeit in den Mittelpunkt therapeutischer Überlegungen zur Therapie von schweren, unter Umständen septisch verlaufenden Infektionen und deren Komplikationen (Hashimoto et al., 2000; Fijen et al., 2001; Hu et al., 2005; Ramana et al., 2006; Guo et al., 2006), da sie ein Schlüsselenzym in der Modulation der Wirtsantwort auf LPS-induzierte Veränderungen im Zellstoffwechsel sein könnte und insbesondere die Liberation proinflammatorischer Zytokine veranlasst (Toledo, 2008). Die prokoagulatorischen Effekte während Endotoxämie, die einen maßgeblichen Anteil an der Pathogenese sepsisinduzierter Mikrozirkulationsstörungen mit Verbrauchskoagulopathie und konsekutivem Multiorganversagen besitzen (Fauci und Longo, 2008), konnten in einem Versuchsmodell am Menschen dosisabhängig durch p38-Inhibition unterdrückt werden (Branger et al., 2003).

Sie spielt weiterhin eine entscheidende Rolle in der Apoptoseregulation humaner leukämischer Zellen (Sengupta et al., 2007), ihre Inhibition verstärkt den Effekt zytostatischer Therapeutika in humanen Myelomzellreihen (Yasui et al., 2007) und führt zur Blutbildrekonstitution in humanem, myelodysplastischem Knochenmark in vitro (Navas et al., 2006).

In einem Rattentiermodell konnte die Angiotensin-II-vermittelte Organtoxizität durch p38-Hemmung erheblich vermindert werden (Bao et al., 2007).

Eine antiatherosklerotische Wirkung der Statine könnte neben der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase auf einer Aktivierung der p38-MAPK und ERK1/2 in humanen Makrophagen beruhen (Yano et al., 2007). Carlin et al. postulieren Statine als ein mögliches Therapeutikum der hypoxieinduzierten pulmonalen Hypertonie, deren antiproliferativer Effekt auf Gefäßfibroblasten auf einem p38-abhängigen Signalmechanismus beruhen soll (Carlin et al., 2007). In einem Ganztiermodell der Maus konnte die Abnahme der kardialen linksventrikulären Pumpfunktion durch ischämisches Remodelling des Myokards nach irreversibler Koronargefäßligatur durch p38-Inhibition vermindert werden (See et al., 2004). Der therapeutische Einsatz von p38-Inhibitoren in präklinischen Studien bei ischämischen Herzerkrankungen wird derzeit diskutiert (Clark et al., 2007).

p38-Inhibitoren und insbesondere Inhibitoren der Isoform p38 α wurden bereits in mehreren Phase-II-Studien auf ihre klinische Wirksamkeit bei inflammatorischen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis oder dem Morbus Crohn geprüft (Pargellis und Regan, 2003; Dominguez et al., 2005; Schreiber et al., 2006).

Die ERK-Kaskade und ihre Aktivatoren werden vor allem durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren stimuliert und sollen eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese spielen (Kolch, 2000). ERK besitzt die Isoenzyme 1 und 2 (ERK1 und ERK2). Die

Regulation der ERK als Antwort auf die LPS-Stimulation wurde bis dato nicht ausreichend charakterisiert (Dauphinee und Karsan, 2006), wobei der ERK-Aktivierung nach neuen Untersuchungen zusätzlich eine TLR-vermittelte Regulation über membranständige G-Proteine (Ras) und Proteintyrosinkinase (Raf) zugrunde liegt (Kogut et al., 2006) (s. Abb. 1, S. 15). Die Aktivierung der ERK1/2-MAPK durch membranständige Tyrosinkinase-Rezeptoren wie z.B. epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), Her-2, vaskulärer EGFR (VEGFR), plättchenabhängiger Wachstumsfaktorrezeptor (PDGFR) und anderer „upstream“-Regulatoren soll durch fakultative aberrante Signaltransduktion (z.B. durch Unterdrückung der Apoptose, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Zellimmortalisierung via Induktion der Telomerasen, Desensibilisierung gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Förderung der Zellinvasivität und Metastasierungstendenz, Hochregulation der Neoangiogenese, Strahlen- und Chemotherapieresistenz durch Induktion von Multi-Drug-Resistance-Genen [MDR-1]) maßgeblich an der zellulären neoplastischen Transformation beteiligt sein (Sridhar et al., 2005). So werden zum aktuellen Zeitpunkt bereits Modulatoren und Rezeptorantagonisten, die in die Signaltransduktion der MAPK und insbesondere der Kaskade Raf/MEK1/2/ERK (s. Abb. 1, S. 15) eingreifen (z.B. EGFR-Antikörper, z.B. Cetuximab; VEGF-Antikörper, z.B. Bevacuzimab; Tyrosinkinase-Inhibitoren, z.B. Erlotinib, Sunitinib, Sorafenib) in präklinischen und klinischen Studien zur antineoplastischen Therapie evaluiert oder sind bereits in der Tumorthherapie etabliert (Huang et al., 2004; Li et al., 2006; Adjei 2006; Kohno und Pouyssegur, 2006). Der EGFR-Antikörper Cetuximab und der VEGF-Antikörper Bevacuzimab sind bereits fester Bestandteil antineoplastischer Kombinationsregime in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms und werden derzeit in Phase-III-Studien zur adjuvanten Therapie des kolorektalen Karzinoms getestet (Saif, 2006; De Gramont et al., 2007). Der Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib konnte als erste antineoplastische Substanz beim hepatozellulären Karzinom (HCC) eine signifikante Lebensverlängerung bewirken (Llovet et al., 2007) und ist seit Oktober 2007 für die Therapie des HCC in Europa zugelassen. Eine Zulassung für die Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms besteht seit Mai 2005. Viele weitere Beispiele bereits etablierter Substanzen zur Modulation der Transduktionsmechanismen auf Zellmembranebene in der Tumorthherapie existieren (Erlotinib in der Therapie des Pankreaskarzinoms und des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms, Cetuximab in der Therapie der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich, Herceptin in der Therapie des Mammakarzinoms, etc.). Die Inhibition membranständiger Rezeptoren (z.B. EGFR, VEGFR) und ihrer Aktivatoren (z.B. EGF, VEGF) hat sich in der antineoplastischen Therapie also

bereits bewährt und bietet für die Zukunft eine interessante Möglichkeit zur Therapieoptimierung durch Modulation von Therapieprotokollen, Indikationserweiterungen der Einzelsubstanzen und Etablierung neuer Inhibitoren.

Abzuwarten bleibt, ob die gezielte pharmakologische Beeinflussung einzelner intrazellulärer MAPK der Komplexität des Zusammenspiels der verschiedensten Transduktions- und Regulationskaskaden Rechnung tragen kann, da die MAPK in ihrer komplexen Rolle als Signalvermittler sowohl protektive als auch antiprotektive Aufgaben erfüllen (Wang, 2007). Insbesondere die vielversprechenden Ergebnisse der p-38-Inhibitoren aus Tier- und Zellkulturmodellen konnten zumeist in klinischen Studien nicht bestätigt werden (Schreiber et al., 2006; Zhang et al., 2007).

Zwischen den drei Signalwegen bestehen zum Teil Quervernetzungen. Alle diese MAPK besitzen einen Threonin-X-Thyrosin-enthaltenden Aktivierungskomplex. Die Diphosphorylierung von Threonin und Thyrosin durch MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK, MKK oder MEK) aktiviert die MAPK. Diese aktivieren wiederum ihre spezifischen Substrate an einer Serin- und/oder Threonin-Bindungsstelle durch Phosphorylierung und konsekutiv Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und „activating protein-1“ (AP-1) (Cobb und Goldsmith, 1995). Das katalytische Potential der MKK bzw. MEK wird ebenfalls durch eine Diphosphorylierung durch MAP-Kinase-Kinase-Kinasen [MAPKKK, MKKK oder MEKK]) initiiert. Die Aktivierung der MAPK und NF κ B durch LPS führt zur Liberation zahlreicher inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , Il-1, Il-2, Il-6 und Il-12. MAPK und insbesondere die p38-MAPK sind entscheidend an der Regulation der Cox-2-Expression und der iNOS beteiligt (Newton et al., 1997; Guan et al., 1998; Chen et al., 1999; Ermert et al., 2002) (s. Abb. 1, S. 15).

In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass ein zentraler Mechanismus der durch LPS vermittelten Pathogenität in dem verwendeten Tiermodell der isolierten, blutfrei perfundierten und artifiziell ventilierten Rattenlunge aus einer Hochregulation der Cox-2/Thromboxan-Synthase-Achse („Priming“-Mechanismus) mit konsekutiver Generierung und Liberation erhöhter Konzentrationen Cox-2- und TxA₂-Synthase-abhängigen Thromboxans nach Gabe eines sekundären inflammatorischen Stimulus (AA) resultiert (Ermert et al., 2000a; Ermert et al., 2000b; Ermert et al., 2000c). Die LPS-induzierte Signaltransduktion nach Erkennung durch den CD14/TLR-4/MD-2-Rezeptorkomplex vermittelt hierbei die Aktivierung der intrazellulären MAPK-Enzymkaskade (Schumann et al., 1996; Ulevitch, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und inwieweit die MAPK p38 und ERK1/2 einen essentiellen Einfluss auf dieses „Priming“-Phänomen ausüben. Dazu wurden die explantierten

Organe in An- oder Abwesenheit von 10.000 ng/ml LPS über einen Zeitraum von 125 Minuten unter kontinuierlicher Messung von PAP, VP, und W rezirkulierend perfundiert, in den Inhibitorexperimenten nach 60 Minuten die drei verschiedenen MAPK-Inhibitoren (die p38-Inhibitoren SB 203580, SC 68376 und der MEK1/2-Inhibitor U 0126) zugesetzt und nach 120 Minuten 10 μ M AA appliziert. Dem Perfusat wurden zu definierten Zeitpunkten Proben zur quantitativen Bestimmung der Konzentrationen von TxB₂ und 6-keto PGF_{1 α} als Metabolite von TxA₂ und PGI₂ entnommen (s. Abb. 3, S. 25).

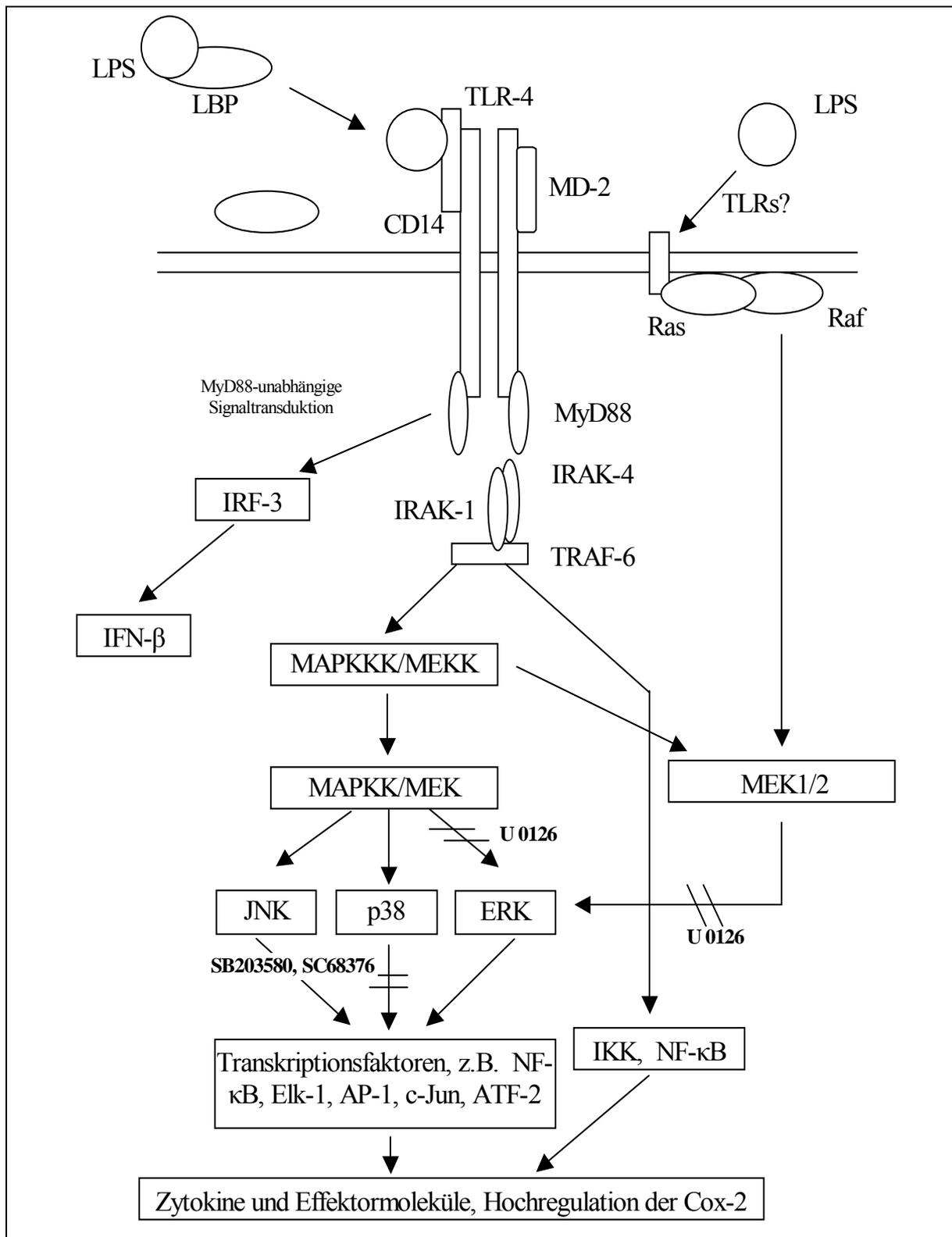


Abb. 1: Signaltransduktion des Lipopolysaccharids

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung

Die essentielle Rolle der Hochregulation der Cox-2/TxA₂-Synthase-Achse als Antwort auf eine Vorbehandlung mit LPS („Priming“-Phänomen) ist an zahlreichen Zellkultur- und Tiermodellen gut belegt und reproduzierbar. Im verwendeten Organmodell der isolierten Rattenlunge führt in LPS-stimulierten Lungen die Zugabe eines sekundären inflammatorischen Stimulus (AA) zur Erhöhung der messbaren veränderlichen Größen (PAP, VP, Organgewicht, Prostanoidliberation). Die Grundzüge der LPS-Signaltransduktion sind oben dargelegt. Eine essentielle Rolle in der Regulation der Signalverarbeitung LPS-aktivierter Zellen scheinen die MAPK zu spielen. Es soll deren Einfluss durch gezielte pharmakologische Beeinflussung untersucht werden. Die einzelnen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit sind:

- Hat eine gezielte pharmakologische Hemmung verschiedener MAPK Einfluss auf die dem „Priming“-Phänomen durch LPS-Stimulation zugrunde liegenden pathophysiologischen Veränderungen (Δ PAP, Δ VP und Δ W) nach Gabe freier Arachidonsäure (sekundärer inflammatorischer Stimulus)?
- Hat eine gezielte pharmakologische Hemmung verschiedener MAPK Einfluss auf die pathophysiologischen Veränderungen (Δ PAP, Δ VP und Δ W) in unstimulierten Rattenlungen nach Gabe freier Arachidonsäure?
- Korreliert die Liberation der vermutlich maßgeblichen und in der vorliegenden Arbeit quantitativ bestimmten Prostanoiden TxB₂ und 6-keto PGF_{1 α} als Metabolite von TxA₂ und PGI₂ mit den beobachteten pathophysiologischen Veränderung in unstimulierten und LPS-stimulierten Rattenlungen nach MAPK-Inhibition?
- Bestehen zwischen den einzelnen MAPK-Inhibitoren Unterschiede in der charakteristischen Beeinflussung der pathophysiologischen Größen und der Prostanoidliberation und lässt sich folglich auf eine differente Beeinflussung der LPS-Signaltransduktion durch die verschiedenen MAPK schließen?

2 Material

2.1 Experimentelle Agenzien und Pharmaka

Die verwendeten p38- und MEK1/2-Inhibitoren werden detailliert unter 3.2.2 beschrieben. Das Lipopolysaccharid stammt von *Salmonella abortus equi* der Firma Cytogen (Bodenheim, Deutschland). Die Arachidonsäure wurde von Paesel und Lorei AG (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Als Narkotikum diente Pentobarbital-Natrium (Narcoren®) der Firma Merial GmbH (Halbergmoos, Deutschland). Zur Antikoagulation wurde Heparin-Natrium von Hofmann La Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) verwendet, zur Lokalanästhesie Xylocain 2 % von der Firma Astra Chemicals (Wedel, Deutschland) bezogen. Für das Lungenmodell wurden männliche Ratten (Sprague Dawley) mit einem Gewicht von 350 g verwendet, die durch die Firma Charles River, Deutschland vertrieben werden.

3 Methoden

3.1 Modell der isolierten Rattenlunge

3.1.1 Einführung

Das Modell der isolierten Rattenlunge als isoliertes, blutfrei perfundiertes und artifiziell ventilertes Organ besteht seit 1995 in Gießen (Ermert et al., 1998a). Das isolierte intakte Organ ist ein von den zentralnervösen, humoralen und metabolischen Einflüssen des Gesamtorganismus unabhängiges experimentelles System. Das Modell eröffnet die Möglichkeit der Messung der physiologischen Organreaktionen, ohne die komplexen Beziehungen der inter- und intrazellulären biochemischen Interaktionen zu stören. Während der Versuche wurden die biophysikalischen Parameter pulmonalarterieller Druck (PAP), der pulmonalvenöser Druck (PVP), Ventilationsdruck (VP) und relative Gewichtsveränderung (ΔW) des Organs mittels Online-Registrierung dokumentiert und dem rezirkulierenden Perfusat an definierten Zeitpunkten Proben zur biochemischen Untersuchung der liberierten Mediatoren mittels ELISA entnommen. Zur Versuchsdurchführung wurde das Herz-Lungen-Paket unter Wahrung der fortlaufenden Ventilation und Perfusion aus dem Thorax entnommen und möglichst störungsfrei in den Versuchsaufbau integriert.

3.1.2 Aufbau des Arbeitsplatzes

Die Perfusion des intakten explantierten Organs erfolgte mittels pulsatilem Fluss mit einer Schlauch-Rollenpumpe. Als Perfusatreervoir dienten zwei zylindrische Doppelwandgefäße von je 100 ml Füllvolumen, die parallel geschaltet in den Kreislauf integriert waren und so einen Wechsel des Perfusionsmediums ohne Unterbrechung der Perfusion gewährleisteten. Die doppelwandigen Reservoirs erlaubten weiterhin die Umspülung der Nähr- und Elektrolytlösung mit einer Temperierflüssigkeit, welche mittels einer kombinierten Thermopumpe für die initiale Präparation auf 4° Celsius abgekühlt wurde. Analog erfolgte die Erwärmung auf 37° Celsius zur eigentlichen Versuchsdurchführung unter physiologischen Bedingungen. Das Perfusat gelangte von dort über die Rollenpumpe in den arteriellen Schenkel des Systems, der mit einer Blasenfalle versehen war, um verbliebene Luftblasen an dem Eintritt in die pulmonale Strombahn zu hindern. Eine zusätzlich in den efferenten Schlauchabschnitt integrierte Heizspirale im Gegenstromprinzip gewährleistete die Temperaturkonstanz des Mediums im rezirkulierenden System. Der arterielle Schenkel wurde mittels einer Metallkanüle in die Pulmonalarterie eingebracht. Von dort gelangte das Perfusat nach Durchströmen des Lungengefäßbettes über einen im linken Ventrikel fixierten Metallkatheter in den venösen Teil des Kreislaufs. Im venösen Schenkel bestand die Möglichkeit, Perfusatproben zu entnehmen. Dies geschah einerseits zur intermittierenden pH-Kontrolle des Mediums, andererseits zur Gewinnung von Material für die spätere Cytokinbestimmung. Nach Passage eines horizontalen Schlauchabschnittes (Abrisspunkt des konstanten Flows) zur Einstellung des pulmonalvenösen Druckes in Referenz zum Lungenhilus erreichte das Perfusionsmedium wieder eines der Doppelwandgefäße. Die Registrierung des pulmonalarteriellen (pulmonalvenösen-) Druckes erfolgte mittels eines in den Silikonschlauch des zuführenden (abführenden) Schenkels eingebrachten Messkatheters, der mit einem elektromechanischen Druckwandler konnektiert war. Das elektrische Signal wurde von einem Messverstärker amplifiziert online registriert. Die Messung des Ventilationsdruckes (VP) erfolgte analog über einen in das Beatmungssystem eingebrachten, vor der proximalen Öffnung der Trachealkanüle platzierten Katheter. Die Massekonstanz/-veränderung der Lunge während des Experiments erfasste eine elektronische Wägezelle, an der das Beatmungssystem des Organs während des Versuchs spannungsfrei befestigt war. Die Registrierung erfolgte ebenfalls signalverstärker- und computergestützt. Die Lunge wurde mit einer synthetischen, sterilen Elektrolyt- und Nährlösung (Krebs-Henseleit-Puffer, I/3, Serag-Wiessner, D-Naila) folgender Zusammensetzung perfundiert:

- Calciumchlorid-Dihydrat 2,40 mM
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat 1,30 mM
- Kaliumchlorid 4,30 mM
- Kaliumdihydrogenphosphat 1,10 mM
- Natriumchlorid 125,00 mM
- Glucose 13,32 mM

Dem Perfusat wurde zusätzlich vor jedem Versuch 25 ml einer 8,4 %-igen Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben, woraus ein pH-Wert von ca. 7,65 resultierte. Die Perfusion des intakten Organs erfolgte initial mit einem Volumenfluss von 4 ml/min, der nach Beendigung der Präparation parallel zur Erwärmung der Lunge auf 13 ml/min. gesteigert wurde. Die Beatmung des Organs wurde volumenkontrolliert mit einem Kleintier-Respirator (Small Animal Ventilator KTR-4, Hugo Sachs, D-March) durchgeführt. Folgende Parameter waren dabei einzuhalten:

- Beatmungsfrequenz 65 bpm
- Tidalvolumen 4 ml
- %-Insp./ %-Plateau/%-Exsp. 40/0/60

Der artifizielle PEEP von 3 cm H₂O wurde mittels Wasserreservoir nach Eröffnen des Thorax zugeschaltet. Die Beatmung erfolgte initial mit Raumluft. Im Versuch selber wurde zusätzlich CO₂ insuffliert. Die angestrebten inspiratorischen Gaspartialdrücke unter Kohlendioxidinsufflation waren:

- CO₂ 25-35 mm Hg
- O₂ 150 mm Hg

Die pH-Regulation während des Versuchs auf physiologische Werte von 7,35-7,40 wurde durch Anpassung des CO₂-Partialdruckes erreicht. Die schematische Darstellung des Versuchsaufbaus ist in Abb. 2 gezeigt.

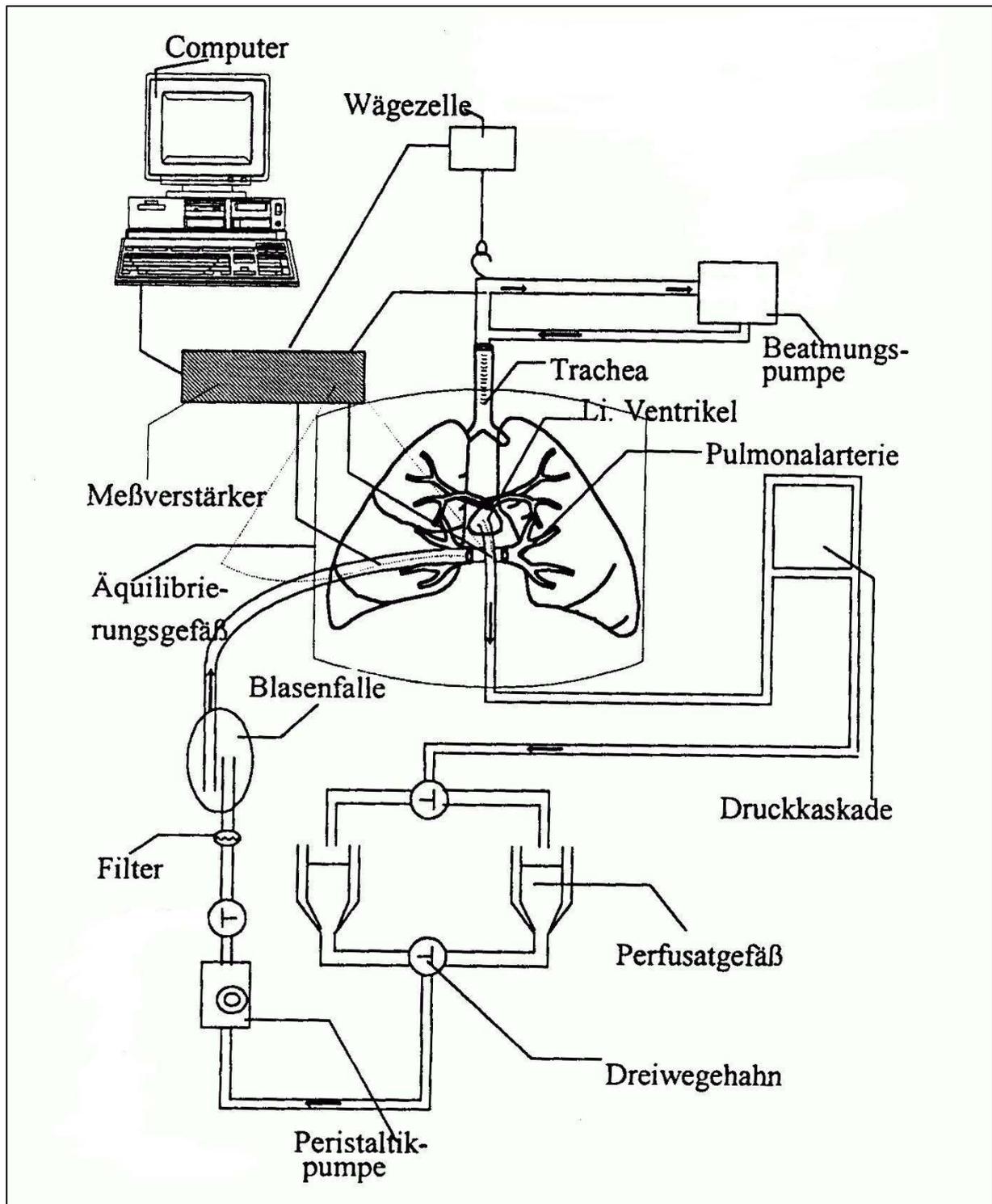


Abb. 2: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung des Einflusses der verschiedenen MAPK-Inhibitoren an der isolierten Rattenlunge in schematischer Darstellung.

3.1.3 Versuchsvorbereitung

Das zuvor maschinell gesäuberte und mittels Formaldehydvergasung sterilisierte Perfusionssystem wurde zunächst unter Kühlung auf 4° Celsius mit 500 ml Aqua ad in injectabile, 500 ml steriler Kochsalzlösung und 500 ml Perfusionsmedium bei maximalem Flow nicht-rezirkulierend durchspült. Hierbei war ein Ausklopfen des gesamten Systems zur Vermeidung von konsekutiven Luftembolien während des Experiments nötig. Das Schlauchsystem war nun in den Versuchsaufbau zu integrieren und anschließend die Perfusion bei einem Flow von 4 ml/min auf rezirkulierend umzustellen.

3.1.4 Präparation

Zunächst erfolgte die perkutane intraperitoneale Applikation des Narkotikums (0,25 ml Narcoren® [Pentobarbital-Natrium]). Eine ausreichende Narkosetiefe bei erhaltener Spontanatmung wurde meist nach 3-5 Minuten erreicht. Das Tier wurde nun auf den Präparationstisch umgelagert und fixiert. Das Präparationsgebiet wurde nun mit Braunovidonlösung desinfiziert. Es folgte eine subkutane prätracheale Infiltrationsanästhesie mit Xylocain® 2%. Danach konnte die Trachea schmerzfrei durch schichtweises Abtragen der Halsweichteile dargestellt und mit einer Pinzette unterfahren werden. Der zweite oder dritte intercartilaginäre Raum distal des Ringknorpels wurde nun zur Hälfte des Tracheaumfangs inzidiert, eine Trachealkanüle eingeführt und diese mit einer Ligatur fixiert. Anschließend wurde das Beatmungssystem konnektiert und ohne endexpiratorischen Druck (PEEP) beatmet.

Es erfolgte ein zweiter medianer Hautschnitt von der Regio umbilicalis bis in den Bereich des ersten Schnitts mit großzügiger Entfernung von Haut und Fell unter Schonung der Thorax- und Bauchwand. Das Xyphoid wurde nun mit einer Klemme gefasst und im Bereich des Epigastriums eine Oberbauchlaparotomie mit nachfolgender Eröffnung entlang der Linea alba bis zum Os pubis und entlang der Rippenbögen bis zur mittleren Axillarlinie unter Schonung des Diaphragmas durchgeführt. Nach Mobilisierung des Darmes erfolgte die Punktion der linken Vena renalis und - nach Aspiration - die Applikation von 1000 I.E. Heparin zur Antikoagulation. Die Vene wurde dann zur Verhinderung von Blutverlusten abgeklemmt.

Nach Anheben des Xyphoids war das Zwerchfell behutsam zu eröffnen, so dass die Lunge kollabierte und in den Thoraxraum zurückfiel. Die CO₂-Insufflation wurde nun begonnen, um

bei bestehender geringer Alkalitoleranz der Lunge ein basischen PH zu vermeiden, und der PEEP zugeschaltet. Nun konnte das Diaphragma an seinem Ansatz entlang des Rippenbogens unter Sicht in Richtung Wirbelsäule gelöst werden. Es folgte eine mediane Sternotomie, die Spreizung des Brustkorbs mittels Thoraxklemmen und die stumpfe Entfernung des Thymusgewebes.

Zunächst wurde der Stamm der großen Gefäße mit einer Pinzette unterfahren und Aorta und Arteria pulmonalis locker mit einem Faden angeschlungen. Der rechte Ventrikel mußte jetzt im Bereich des Conus arteriosus inzidiert, der arterielle Katheter ohne Unterbrechung der Lungenperfusion in die Inzision eingebracht und die vorher gelegte Ligatur zugezogen werden. Zur Gewährleistung eines freien Abflusses des Perfusionsmediums aus der pulmonalen Strombahn zur Verhinderung eines konsekutiven Lungenödems musste sogleich die Herzspitze eröffnet werden. Mit der beschriebenen Technik des Einbringens des arteriellen Katheters bei artifiziellem Flow am vitalen Tier konnten Luftembolien der Lungenstrombahn verhindert werden. Die Lunge war nun bzgl. Perfusion und Ventilation vollständig vom Tierkörper getrennt. Das Lungenparenchym sollte sich nun gleichmäßig weiß färben. Nun wurden unterhalb der Lunge die Vena cava, Aorta descendens und der Oesophagus durchtrennt. Das Mediastinum konnte jetzt durch stumpfe Präparation von der Wirbelsäule gelöst, das Organpaket (Herz/Lunge) aus dem Thorax entnommen und an der Trachealkanüle hängend in den Versuchsaufbau integriert werden.

3.1.5 Integration in das Meßsystem

Es folgte die Sondierung des linken Herzvorhofs mittels venösem Katheter und konsekutiver Dehnung des linken Herzohres. Dieses Vorgehen verhinderte erfahrungsgemäß, daß spontane Vorhoferregungen auftraten und das spätere Druckmonitoring störten. Der Katheter wurde nun im linken Ventrikel belassen und mit einer Ligatur fixiert. Der venöse Systemschenkel wurde konnektiert und das rezirkulierende Perfusat auf Ablauf gestellt und verworfen, um das Blut und dessen freie corpuskuläre Bestandteile weitgehend aus der pulmonalen Strombahn zu eliminieren. Nach Anschluß der Druckaufnehmer und Nullabgleichung der Druckwandler gegen atmosphärischen Druck in Höhe des Lungenhilus wurde die Lunge an der Wägezelle hängend in einem temperierten Trog platziert. In der nun folgenden circa zwanzigminütigen Phase wurde bei kontinuierlicher Registrierung des pulmonalarteriellen Druckes (PAP), des pulmonalvenösen Druckes (PVP), des Ventilationsdruckes (VP) und des Lungengewichtes

der Perfusionsfluß von 4 ml/min auf 13 ml/min gesteigert sowie die Temperatur von 4° Celsius auf 37° Celsius erhöht. Während dieser Zeit wurde der pH wiederholt kontrolliert, unter Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit des verwendeten Bikarbonat/CO₂-Puffersystems mittels CO₂-Insufflation korrigiert und bei erwärmter Lunge auf Werte von 7,35-7,40 eingestellt. Nach Erreichen des maximalen Perfusatflusses und der Perfusatendtemperatur wurde der pulmonalvenöse Druck mittels Druckkaskade auf Werte um 1,5 bis 2 mm Hg eingestellt, um expiratorisch Zone III-Bedingungen nach West in allen Lungenarealen zu gewährleisten und die Perfusion für die Dauer des Versuchs auf rezirkulierend umgestellt. Einschlusskriterien für die Verwendung des explantierten Organs im Versuch waren:

1. homogene Weißfärbung der Lungenoberfläche nach Elimination des Blutes
2. Nichtvorhandensein von sichtbaren Atelektasen oder Ödemen
3. Druck- und Gewichtskonstanz während der 30-minütigen Steady-State-Phase
4. Einhaltung der Referenzwerte für Perfusions- (PAP 4-6 mm Hg, PVP 1,5-2 mm Hg) und Beatmungsdruck (VP 7-12 cm H₂O)
5. Dichtigkeit des Organs, des Schlauchsystems sowie der Konnektionsstellen zwischen Organ und Schlauchsystem

Alle Einschlusskriterien waren in hohem Maße Merkmale für die Güte der Versuchsvorbereitung und Präparation. Ein diesbezüglicher Fehler bedeutete den Versuchsausschluss.

3.1.6 Versuchsende

Nach jedem durchgeführten Experiment wurde das Perfusionssystem kurzgeschlossen und unter maximalem Flow mit einem Liter Aqua destillata gesäubert. Es folgte die ausgiebige maschinelle Reinigung des Systems inklusive der arteriellen und venösen Metallkanülen und Druckmesskatheter unter Zugabe einer waschaktiven Substanz bei 60° Celsius und nachfolgende Spülung mit deionisiertem Wasser in einer eigens dafür vorgesehenen Spülmaschine. Alle Bestandteile wurden anschließend manuell durch Ausblasen mit Druckluft getrocknet. Abschließend erfolgte eine Sterilisation des gereinigten Systems mittels Vergasung von Formaldehyd im Indikatorverfahren in den dafür vorgesehenen

gasdurchlässigen Verpackungen in der klinikseigenen Sterilisationsabteilung. Die Doppelwandgefäße und die Heizspirale waren nach der maschinellen Reinigung an ihren inneren Lumina mit Aluminiumfolie zu verschließen und im Heizofen bei 200° Celsius für zwei Stunden heißsterilisieren. Sowohl die im Experiment verwendeten Einmalpipettenspitzen zur Probengewinnung und Agenzienapplikation als auch die Reservoirgefäße (Epis) zur Probenlagerung wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert. Durch dieses Procedere konnte ein steriler und pyrogenarmer Versuchsaufbau etabliert werden.

3.2 Versuchsgruppen

Die jeweilige Anzahl (n) der durchgeführten Einzelexperimente pro Versuchsgruppe betrug 5. Nach der initialen steady-state Phase wurden die isolierten Rattenlungen vom Zeitpunkt $t=0'$ 130 Minuten blutfrei perfundiert und artifiziell ventiliert. Bei allen Versuchsgruppen wurde nach Ablauf von 120 Minuten dem Perfusat AA in einer Konzentration 10 $\mu\text{mol/l}$ zugegeben. Die Kontrollexperimente ohne Verwendung pharmakologischer Agenzien wurden mit und ohne Zusatz von LPS durchgeführt. Bei Zugabe von LPS wurde eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zum Zeitpunkt $t=0'$ appliziert.

Die Experimente unter Verwendung pharmakologischer Agenzien (MAPK-Inhibitoren) wurden in der selben Weise durchgeführt, d.h. mit und ohne Zusatz von LPS. Die verschiedenen MAPK-Inhibitoren wurden zum Zeitpunkt $t=60'$ verabreicht (s. Abb. 3). Der optimale Zeitpunkt wurde in vorab durchgeführten Versuchen als der Zeitpunkt mit der maximalen Effektivität hinsichtlich Beeinflussung der messbaren veränderlichen Größen im Vergleich zu Kontrollexperimenten bestimmt (s. Abb. S. 25).

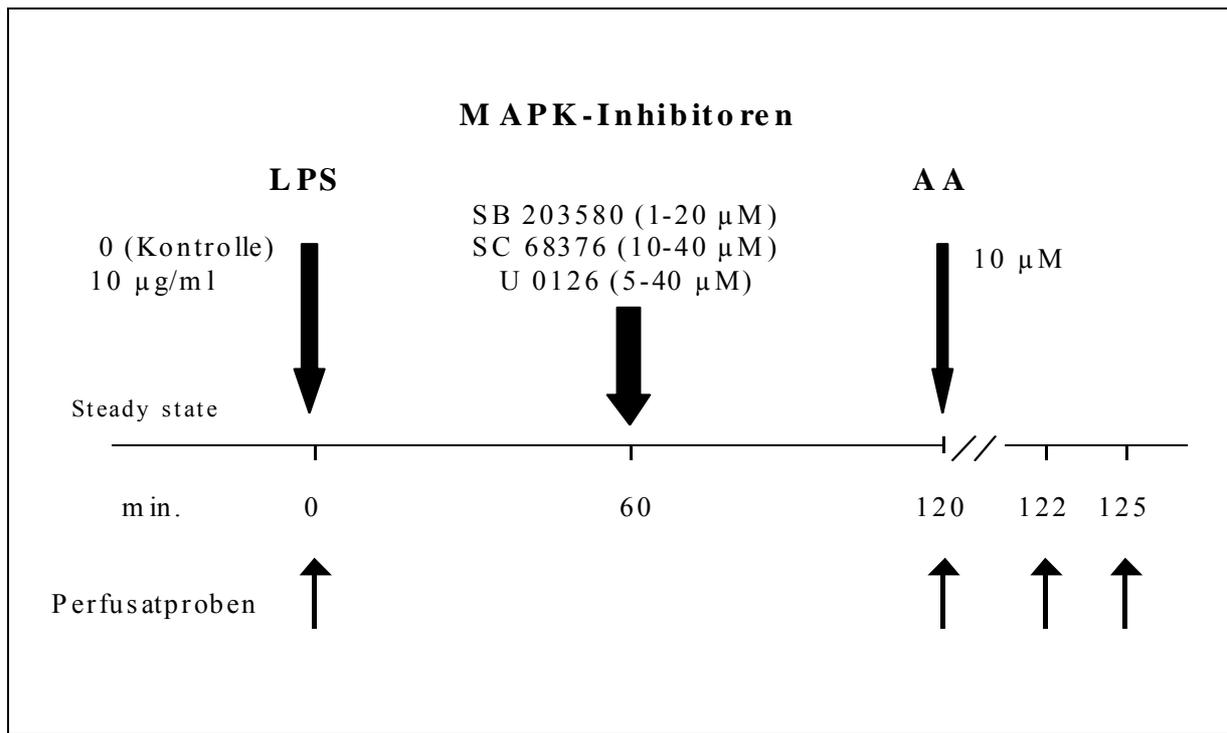


Abb. 3: Zeitlicher Versuchsablauf mit Darstellung der Substanzgaben und der Entnahmezeitpunkte der Perfusatsproben.

3.1.1 Perfusatsproben

Zu den definierten Zeitpunkten $t=0'$ (Versuchsbeginn), $120'$ (vor AA-Applikation), $122'$, $125'$ wurden dem rezirkulierenden Perfusat Proben zur quantitativen Bestimmung der AA-Metabolite TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei -80° Celsius tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt analysiert.

3.1.2 Detailbeschreibung der verwendeten MAPK-Inhibitoren (s.a. Abb. 1, S. 15)

Die experimentelle Anwendung der aufgeführten Agenzien erfolgte nach dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll.

Substanz 1: Einsatz des p38-(MAPK)-Inhibitors SB 203580 [4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole], Calbiochem (Bad Soden, Deutschland).

Molare Masse: 377.4

Lösungsmittel: DMSO

Applizierte Konzentrationen: 1, 5, 10, 20 μ M

Wirkmechanismus: kompetitiver Inhibitor der p38-Aktivierung durch Blockade der zweifachen Phosphorylierung der Aktivierungs-Bindungsstelle Threonin-Glycin-Tyrosin (Frantz et al., 1998)

Substanz 2: Einsatz des p38-(MAPK)-Inhibitor SC68376 [2-Methyl-4-phenyl-5-(4-pyridyl)oxazole], Calbiochem (Bad Soden, Deutschland).

Molare Masse: 236.3

Lösungsmittel: DMSO

Applizierte Konzentrationen: 20, 40 μ M

Wirkmechanismus: Hemmung der katalytischen Aktivität der p38-MAPK (Guan et al., 1998)

Substanz 3: Einsatz des MEK1/2-(MAPK-Aktivator [MAPKK])-Inhibitors U 0126 [1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene], Promega Corporation (Madison, USA).

Molare Masse: 426.5

Lösungsmittel: DMSO

Applizierte Konzentrationen: 5, 10, 20, 40 μ M

Wirkmechanismus: Nicht kompetitiver Inhibitor der katalytischen Aktivität der MEK1/2 (Favata et al., 1998)

3.3 ELISA-Messungen

Die Bestimmung der Konzentrationen der Prostaganoide der aus dem Perfusionsmedium zu definierten Zeitpunkten entnommenen Proben erfolgte mittels kommerzieller ELISA Kits. Zur Messung der TxA_2 - und PGI_2 -Konzentrationen wurden deren Abbauprodukte TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ bestimmt. 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ wird in der pulmonalen Strombahn weder aufgenommen noch metabolisiert. TxB_2 durchläuft weitere Metabolisierungsschritte. Die Nachfolgeprodukte wurden durch den verwendeten ELISA nicht detektiert. Bei der Durchführung der Messungen wurden die vom Hersteller angegebenen Richtlinien eingehalten.

3.4 Statistik

Die Daten wurden in Mittelwerten \pm SEM angegeben. Der statistische Vergleich mehrerer Datenreihen basierte auf einer Varianzanalyse (ANOVA [Analysis of variance]) mit dem Newman-Keuls-Test bei Signifikanz. Die statistische Auswertung nur zweier Datenreihen erfolgten mit dem ungepaarten t-Test. Statistische Signifikanz wurde für alle Vergleiche bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Kontrollexperimente mit und ohne LPS-Stimulation (ohne MAPK-Inhibitorzugabe)

4.1.1 Veränderung der pathophysiologischen Parameter in LPS-stimulierten und unstimulierten Kontrollexperimenten

In der Kontrollgruppe ohne Gabe von LPS zum Zeitpunkt $t=0'$ traten über den gesamten Beobachtungszeitraum von 120 Minuten keine signifikanten Veränderung der messbaren physiologischen Parameter PAP, VP und Organgewicht auf. Der AA-Applikation in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ nach 120 Minuten Versuchsdauer folgte ein rascher Anstieg des PAP von 3–4 mm Hg innerhalb von 5 Minuten, eine minimale Zunahme des VP von 0,1 mm Hg und eine Zunahme des Organgewichts von 0,5 g.

In der Kontrollgruppe mit Gabe von $10 \mu\text{g/ml}$ LPS zum Zeitpunkt $t=0'$ zeigten sich in Analogie zur unstimulierten Gruppe ebenfalls keine Veränderungen von PAP, VP und W über den gesamten Beobachtungszeitraum von 120 Minuten. Aus der Gabe von $10 \mu\text{M}$ AA nach 120 Minuten Versuchsdauer resultierte aber eine vielfach amplifizierte Veränderung der messbaren Parameter. So war im Vergleich zur mit LPS unstimulierten Gruppe der Anstieg des PAP etwa 3-fach (ΔPAP 10-11 mm Hg) erhöht, begleitend nahmen VP und W im Mittel um 2,4 mm Hg und um 5 g zu (s. Abb. 4). In Korrelation zum Gewichtsanstieg beobachtete man am isolierten Organ eine deutliche Ödembildung. Diese Beobachtungen an der isolierten Rattenlunge sind reproduzierbar und durch frühere Studien unserer Arbeitsgruppe gut belegt (Ermert et al., 2000c).

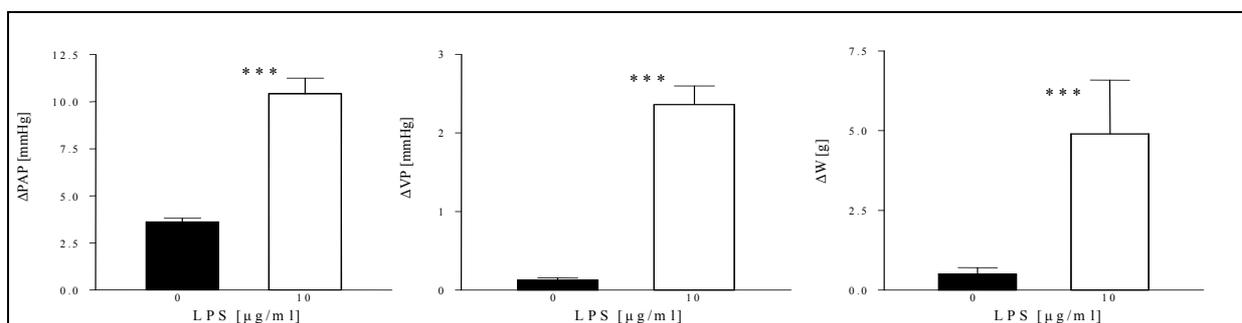


Abb. 4: Die Grafik veranschaulicht den pathophysiologischen Effekt des „Priming“- Mechanismus nach Gabe von $10 \mu\text{g/ml}$ LPS zum Versuchsbeginn. Dargestellt sind die Anstiege (Δ) von PAP, VP und W zum Zeitpunkt $t=125'$ nach Applikation von $10 \mu\text{M}$ AA nach 120 Minuten Versuchsdauer in unstimulierten (0 $\mu\text{g/ml}$ LPS) und LPS-stimulierten („geprimten“) Rattenlungen. *** ($p<0,001$) = signifikante Differenz der MW von ΔPAP , ΔVP und ΔW zu den Versuchen ohne LPS.

4.1.2 Veränderung der Prostanoidliberation in LPS-stimulierten und unstimulierten Kontrollexperimenten

Während der Versuchsdauer bis zur Applikation der AA zeigte sich in LPS-stimulierten und unstimulierten Lungen keine wesentliche Zunahme der Liberation von TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$. In LPS-stimulierten Lungen kam es zwar zum langsamen, im Vergleich zum Zeitpunkt $t=0'$ aber nicht signifikanten Anstieg beider Prostanoiden während der Versuchsdauer von 120 Minuten (Mittelwert [MW] TxB_2 $t=0'$ bzw. $120'$: 119.2 pg/ml bzw. 350.8 pg/ml; MW 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ $t=0'$ bzw. $120'$: 1469 pg/ml bzw. 5396 pg/ml). Nach AA-Gabe ($t=125'$) folgte dann ein Konzentrationsgipfel beider Prostanoiden im Perfusat sowohl in unstimulierten als auch in LPS-stimulierten Rattenlungen. TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ wurden in LPS-stimulierten Lungen im Vergleich zum Ausgangswert $t=120'$ um den Faktor 16 bzw. 8 vermehrt liberiert, in unstimulierten Rattenlungen um den Faktor 11 bzw. 23. Insgesamt war bei den LPS-stimulierten Rattenlungen die Konzentration von TxB_2 im Perfusat im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne LPS zum Zeitpunkt $t=120'$ vor AA-Applikation als auch nach deren Gabe statistisch signifikant erhöht. Die Konzentration von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ in LPS-stimulierten im Vergleich zu unstimulierten Lungen zeigte zum Zeitpunkt $t=120'$ ebenfalls einen statistisch signifikanten Gradienten, nach AA-Applikation lag dagegen kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Versuchsgruppen vor (s. Abb. 5).

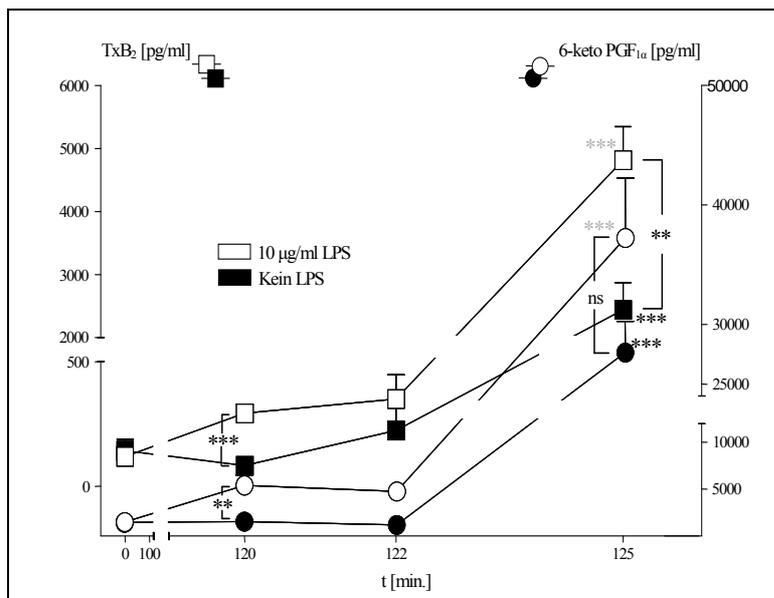


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Liberation von TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ im rezirkulierenden Perfusat in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen ohne Inhibitorzusatz. *** ($p < 0,001$) = signifikante Differenz der MW von TxB_2 (6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$) zum Zeitpunkt $t=125'$ im Vergleich zu $t=120'$. ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,001$), ns = signifikante Differenz (bzw. keine Signifikanz) der MW von TxB_2 (6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$) in unstimulierten Lungen im Vgl. zu LPS-stimulierten Lungen zu den Zeitpunkten $t=120'$ und $t=125'$.

4.2 Die p38-Inhibitoren SB 203580 und SC 68376

4.2.1 Beeinflussung der pathophysiologischen Parameter in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen durch p38-Inhibition

Die Verwendung des p38-Inhibitors SB 203580 (Applikation von 0, 1, 5, 10, 20 μM SB 203580 jeweils 60 Minuten nach Versuchsbeginn) hatte keinen Einfluss auf die veränderlichen Variablen PAP, VP und W während der einstündigen Versuchsphase vom Expositionszeitpunkt bei $t=60'$ bis zur AA-Applikation, unterdrückte aber nach Gabe von 10 μM AA nach 120 Minuten dosisabhängig den pulmonalarteriellen Druckanstieg, die Zunahme des Ventilationsdruckes und des Organgewichtes sowohl in LPS-stimulierten als auch unstimulierten Rattenlungen, so dass bei größter evaluierter Inhibitorkonzentration fast keine Veränderungen der messbaren Größen detektierbar waren (bei 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 20 μM SB 203580 $t=125'$: ΔPAP 0,48 mmHg, ΔVP 0 mmHg, ΔW 0 g; kein LPS + 20 μM SB 203580 $t=125'$: ΔPAP 0,18 mmHg, ΔVP 0 mmHg, ΔW 0 g) und annähernd das Ausgangsniveau vor AA-Applikation beibehalten wurde (s. Abb. 6 und 7, S. 31). Der p38-Inhibitor SC 68376 wurde nur in LPS-stimulierten Lungen in den Konzentrationen 20 und 40 μM appliziert und zeigte äquivalente Ergebnisse, wobei eine maximale Inhibition nicht evaluiert wurde (s. Abb. 8 und 9, S. 31).

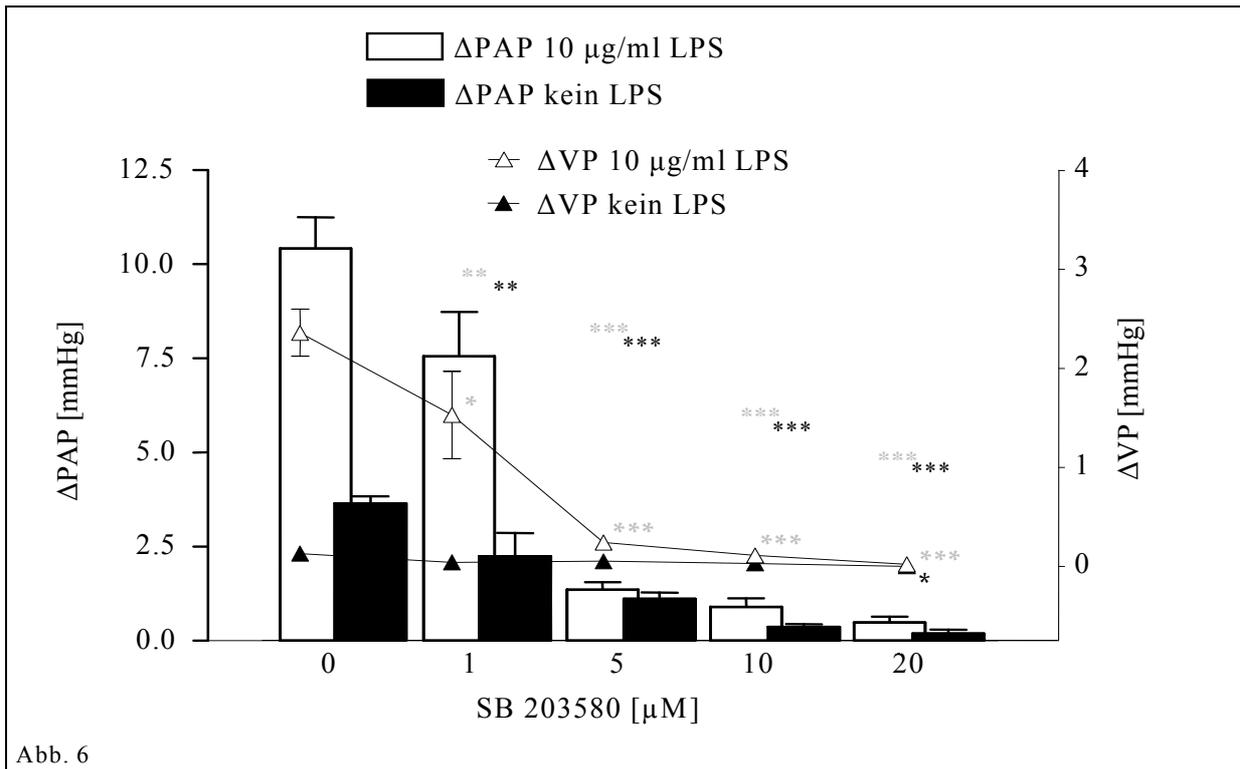


Abb. 6

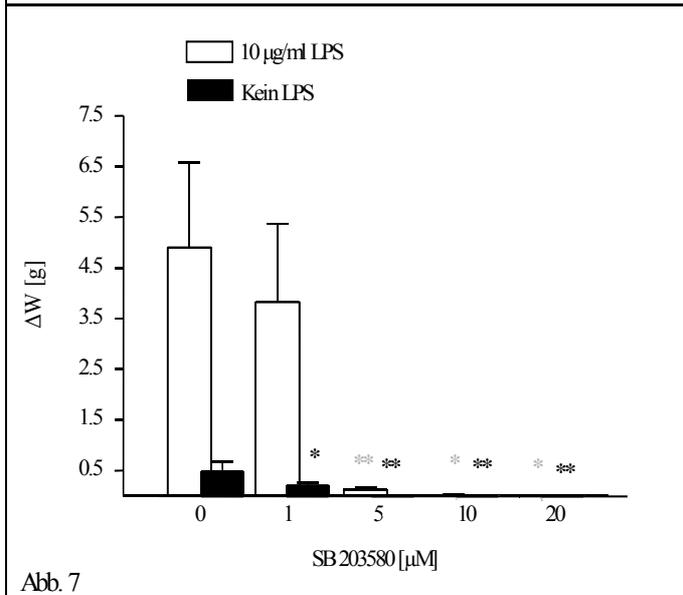


Abb. 7

Abb. 6, 7, 8 und 9: Darstellung der dosisabhängigen Inhibition von Δ PAP, Δ VP und Δ W zum Zeitpunkt $t=125'$ (AA-Applikation $t=120'$) nach Gabe der p38-Inhibitoren SB 203580 (s. links [Abb. 7] und oben [Abb. 6]) und SC 68376 (s. links unten [Abb. 8] und unten [Abb.9]) bei $t=60'$. *** ($p<0,001$), ** ($p<0,01$), * ($p<0,05$) = signifikante Differenz der MW von Δ PAP, Δ VP und Δ W der Inhibitorgruppen mit und ohne LPS-Stimulation im Vgl. zu ihren Kontrollgruppen (0 μ M). SC 68376 wurde nur in LPS-stimulierten Gruppen evaluiert.

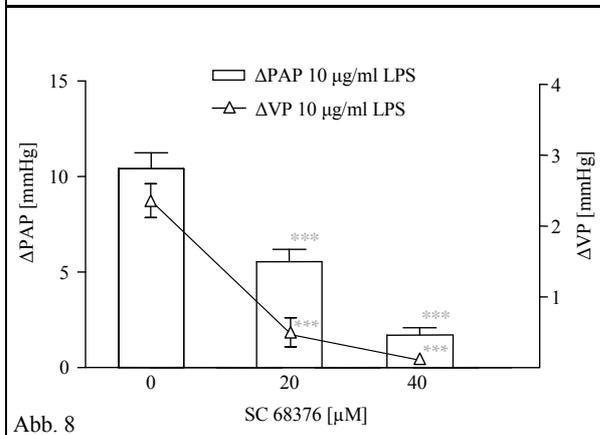


Abb. 8

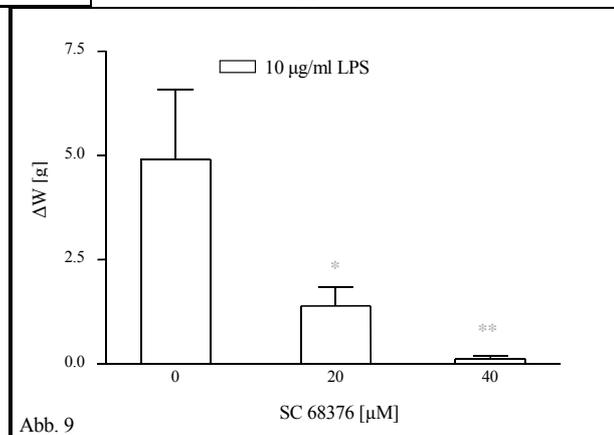


Abb. 9

4.2.2 Beeinflussung der Prostanoidliberation in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen durch p38-Inhibition

Zum Zeitpunkt $t=120'$ vor AA-Applikation zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der Konzentration von TxB_2 im rezirkulierenden Perfusat sowohl in LPS-stimulierten als auch unstimulierten p38-inhibierten (SB203580) Lungen (s. Abb. 10, S. 33). Nach AA-Gabe ($t=125'$) fand sich in den Rattenlungen in Analogie zur Unterdrückung der pathophysiologischen Parameter ΔPAP , ΔVP und ΔW sowohl in den LPS-stimulierten als auch in den unstimulierten Versuchsgruppen ebenfalls eine dosisabhängige, signifikante Abnahme der TxB_2 -Liberation (s. Abb. 11, S. 33). Die Liberation von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ blieb sowohl während der zweistündigen Versuchsdauer vor Zugabe der AA (s. Abb. 19, S. 70) als auch nach deren Applikation von der SB 203580-Gabe unberührt (s. Abb. 11, S. 33), da sich zu den Zeitpunkten $t=120'$ und $t=125'$ keine signifikanten Differenzen der Konzentrationen von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ der Inhibitorgruppen im Vergleich zu den Kontrollexperimenten mit und ohne Zugabe von Endotoxin zeigten. Die verminderte TxB_2 -Liberation bei Verwendung des p38-Inhibitors SB 203580 erreichte zum Zeitpunkt $t=125'$ bereits bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen ein etwa gleiches Niveau. Bei maximaler SB 203580-Inhibition ($20 \mu\text{M}$) lag bei LPS-stimulierten Lungen eine Verminderung der TxB_2 -Konzentration um den Faktor 12 (MW der Gruppe ohne Inhibitorzugabe 4813 pg/ml , MW der Gruppe $20 \mu\text{M}$ SB 230580 423 pg/ml) vor, bei unstimulierten Versuchen um den Faktor 8 (MW der Gruppe ohne Inhibitorzugabe 2440 pg/ml , MW der Gruppe $20 \mu\text{M}$ SB 230580 293 pg/ml) (s. Abb. 11, S. 33). Der p38-Inhibitor SC 68376 verursachte in LPS-stimulierten Rattenlungen in äquivalenter Weise eine dosisabhängige Reduktion der TxB_2 -Liberation und ließ die Freisetzung von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ unbeeinflusst (s. Abb. 12 und 13, S. 34).

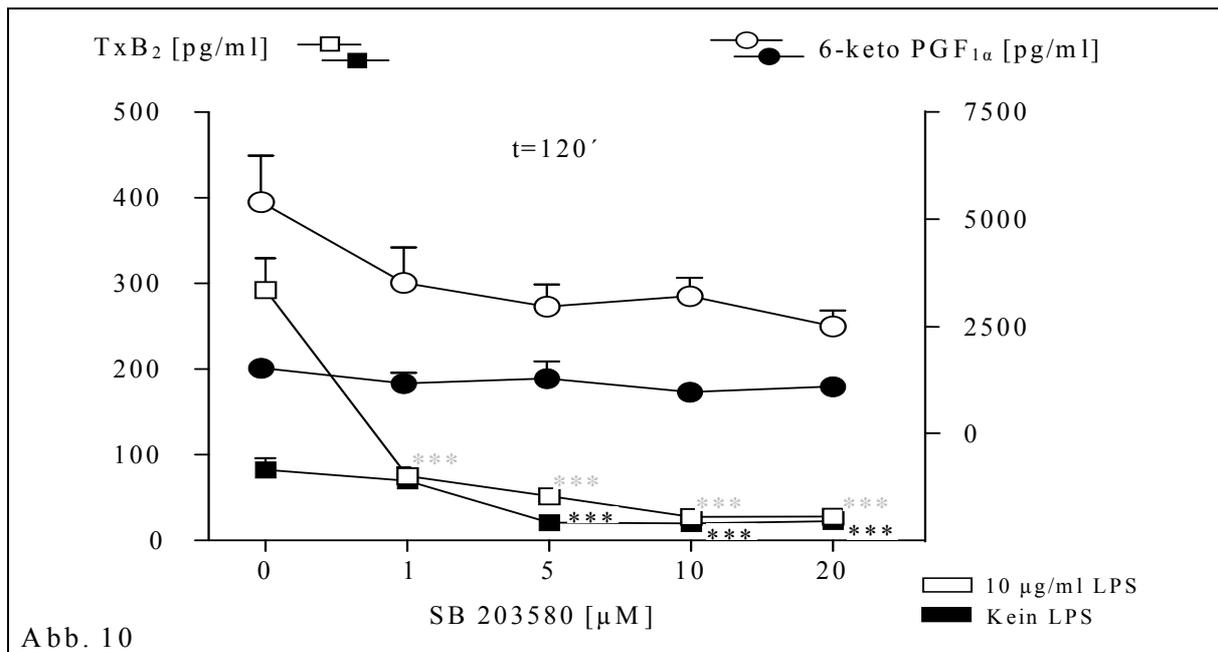


Abb. 10

Abb. 10 u. 11: Darstellung der dosisabhängigen Verminderung der TxB_2 -Liberation LPS-stimulierter und unstimulierter Rattenlungen durch p38-Inhibition (SB 203580) zu den Zeitpunkten $t=120'$ unmittelbar vor AA-Applikation [s. oben] und $t=125'$ 5 Minuten nach AA-Zusatz [s. unten]. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) = signifikante Differenz der MW der Konzentration von TxB_2 der p38-inhibierten Versuchsgruppen im Vgl. zu Kontrollgruppen ohne Inhibitorzusatz (0 μM). Die vielfach amplifizierte Prostanoidliberation nach Gabe des sekundären inflammatorischen Stimulus (AA) findet in der unterschiedlichen Skalierung der Graphen Niederschlag. Die Synthese von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ bleibt von der p38-Inhibition unberührt. Der zeitliche Verlauf der Prostanoidliberation von TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ über die ersten zwei Stunden Versuchsdauer ist in den Abb. 18 und 19 im Anhang (s. S. 69 und 70) abgebildet.

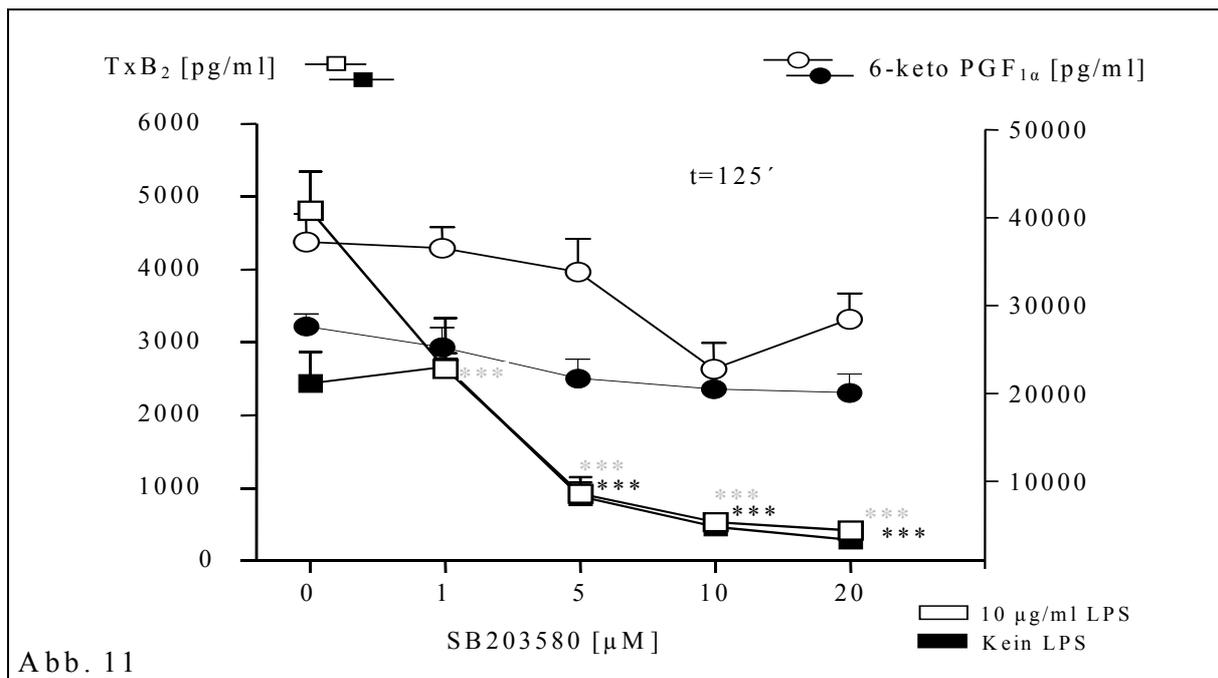


Abb. 11

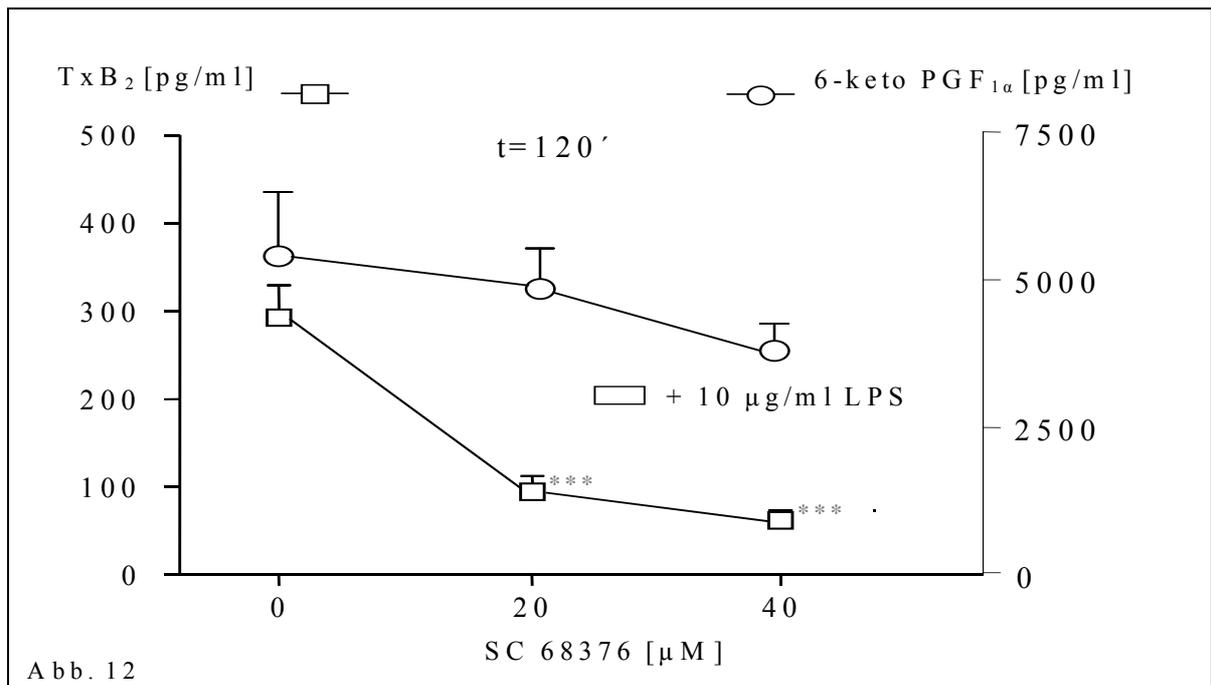
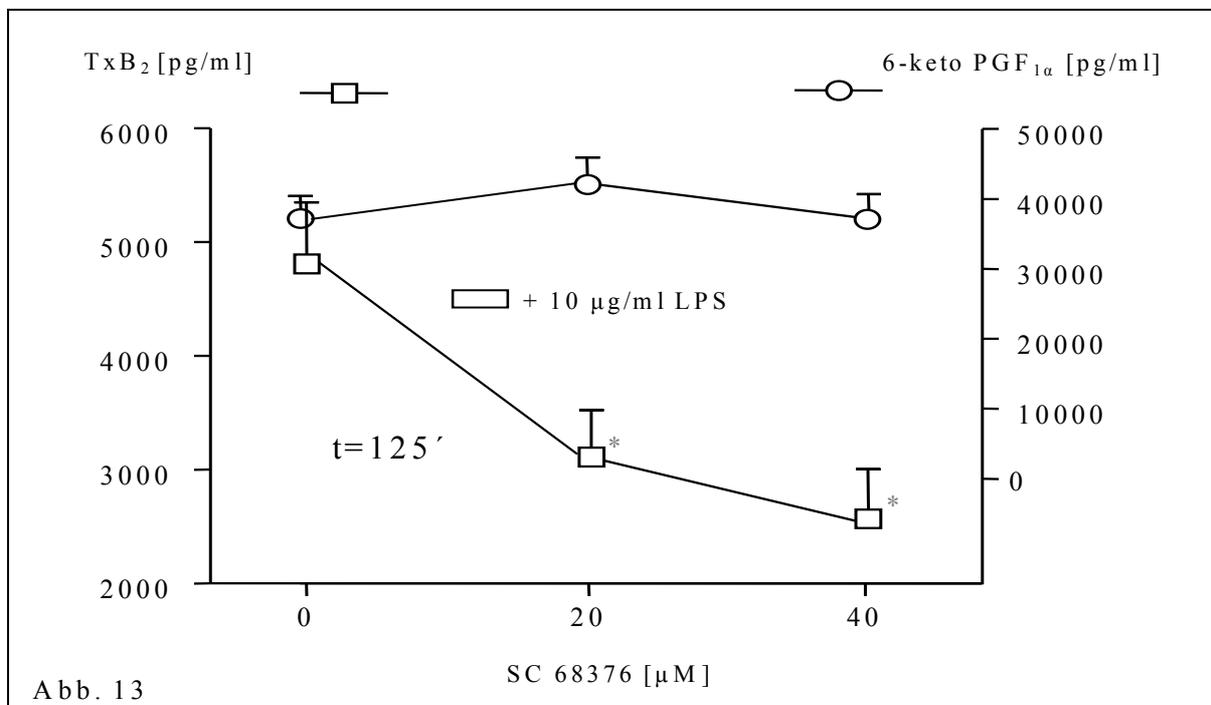


Abb. 12 und 13: Darstellung der dosisabhängigen Verminderung der TxB₂-Liberation LPS-stimulierter Rattenlungen durch p38-Inhibition (SC 68376) zum Zeitpunkt t=120' vor AA-Applikation [s. oben] und t=125' 5 Minuten nach AA-Zusatz [s. unten] in Analogie zu den Ergebnissen der SB 203580-Gabe (Abb.10 und 11). Der p38-Inhibitor SC 68376 wurde nur in LPS-stimulierten Gruppen evaluiert. *** (p<0,001), ** (p<0,01), * (p<0,05) = signifikante Differenz der MW der Konzentration von TxB₂ der p38-inhibierten Versuchsgruppen im Vgl. zu Kontrollgruppen ohne Inhibitorzusatz (0 μM). Die Synthese von 6-keto PGF_{1α} bleibt von der p38-Inhibition (SC 68376) ebenso unberührt.



4.3 Der MEK1/2-Inhibitor U 0126

4.3.1 Beeinflussung der pathophysiologischen Parameter in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen durch MEK1/2-Inhibition

Die Gabe des MEK1/2-(MAPK-Aktivator- [MAPKK])-Inhibitors U 0126 (Applikation von 0, 5, 10, 20, 40 μM U 0126 60 Minuten nach Versuchsbeginn) führte zu keiner Veränderung der Variablen PAP, VP und W während der einstündigen Versuchsphase vom Expositionszeitpunkt bei $t=60'$ bis zur AA-Exposition, unterdrückte aber dosisabhängig und statistisch signifikant die pulmonalarterielle Druckantwort, die Zunahme des Ventilationsdruckes und des Organgewichtes nach Applikation von 10 μM AA nach 120 Minuten in LPS-stimulierten Rattenlungen. Dabei erreichten die messbaren Größen (ΔPAP , ΔVP und ΔW) in LPS-stimulierten Lungen bei maximaler evaluierter Inhibitorkonzentration annähernd das Niveau unstimulierter Lungen mit Inhibitorzugabe bzw. unstimulierter Lungen ohne Inhibitorzugabe. Die unstimulierten Versuchsgruppen mit Inhibitorzugabe zeigten keinen signifikanten Unterschied der pathophysiologischen Größen ΔPAP , ΔVP und ΔW nach AA-Gabe zu den Kontrollversuchen ohne LPS. U 0126 hatte somit in unstimulierten Versuchsgruppen keine Auswirkungen auf die Veränderung der messbaren Größen und supprimierte in inflammatorischen Experimenten die veränderlichen Variablen PAP, VP und W auf den Stand der unstimulierten Inhibitorgruppen bzw. der unstimulierten Kontrollgruppe (s. Abb. 14 und 15, S. 36).

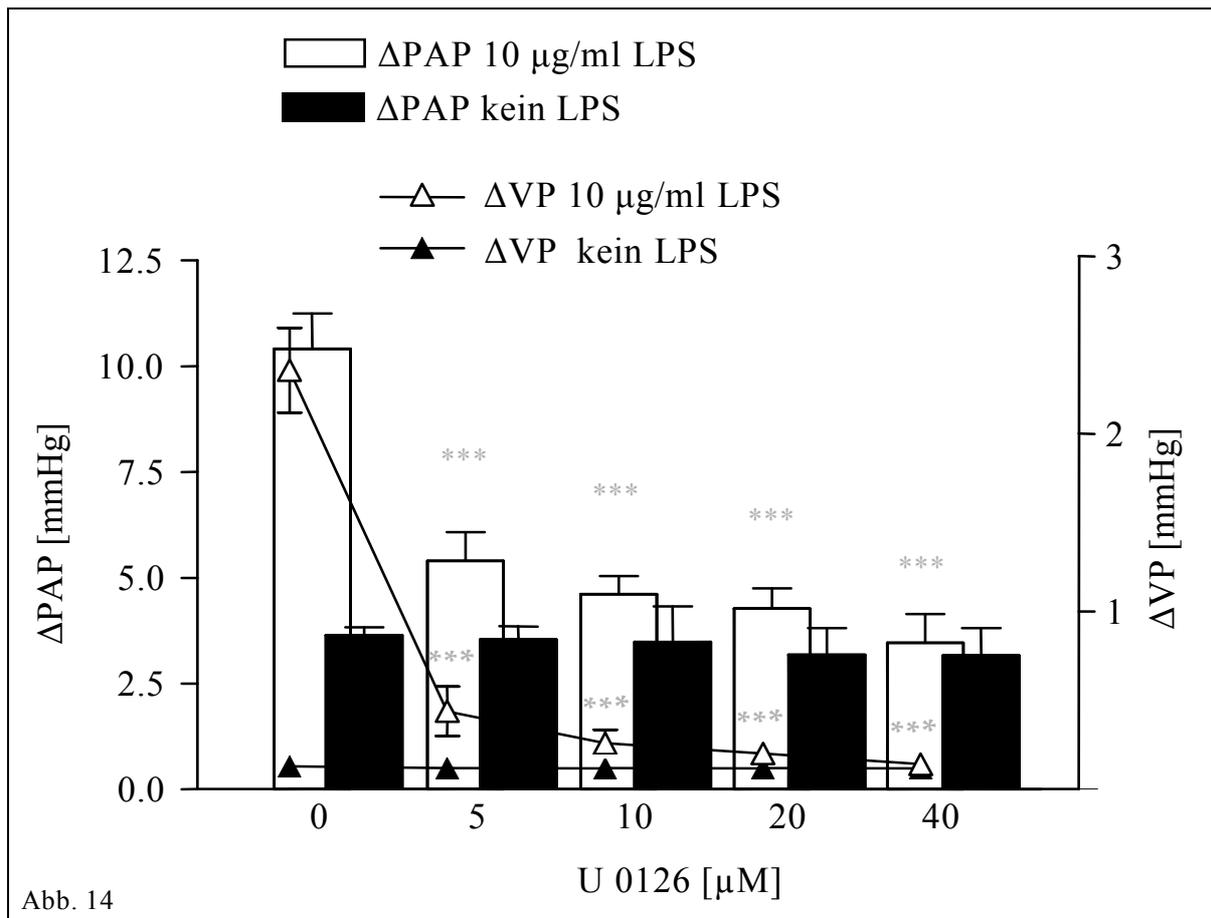
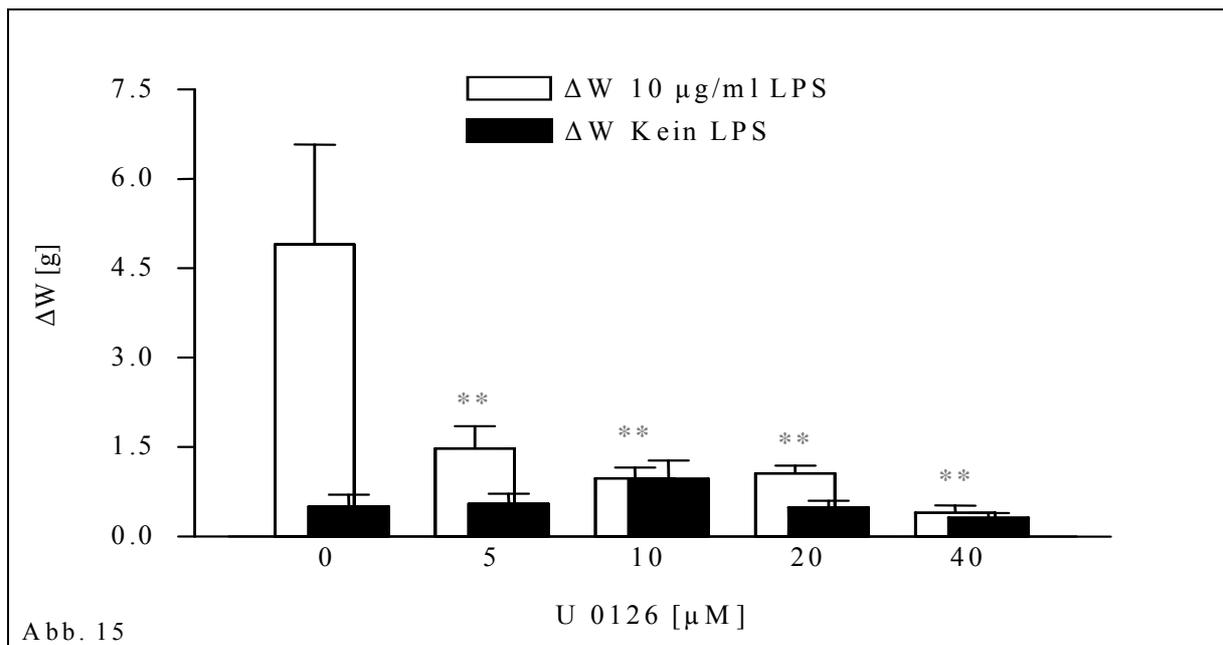


Abb. 14 und 15: Darstellung der dosisabhängigen Inhibition von Δ PAP, Δ VP (oben) und Δ W (unten) zum Zeitpunkt $t=125'$ (AA-Applikation $t=120'$) nach Gabe des MEK1/2-Inhibitors U 0126 bei $t=60'$. *** ($p<0,001$), ** ($p<0,01$), * ($p<0,05$) = signifikante Differenz der MW von Δ PAP, Δ VP und Δ W der Inhibitorgruppen mit und ohne LPS-Stimulation im Vgl. zu ihren Kontrollgruppen ohne Inhibitorzugabe ($0 \mu\text{M}$).



4.3.2 Beeinflussung der Prostanoidliberation in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen durch MEK1/2-Inhibition

Zum Zeitpunkt $t=120'$ vor AA-Applikation zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der Konzentration von TxB_2 im rezirkulierenden Perfusat nur in LPS-stimulierten Experimenten (s. Abb. 16, S. 38). In Analogie zur ausschließlichen Unterdrückung der pathophysiologischen Parameter ΔPAP , ΔVP und ΔW zum Zeitpunkt $t=125'$ unter inflammatorischen Bedingungen fand sich nach Applikation von AA ebenfalls nur in den LPS-stimulierten Versuchsgruppen eine dosisabhängige, signifikante Abnahme der TxB_2 -Konzentrationen ($t=125'$) im rezirkulierenden Perfusat. Die U 0126-Gabe hatte keine Auswirkungen auf die TxB_2 -Liberation in unstimulierten Lungen sowohl vor als auch nach AA-Gabe (s. Abb. 16 und 17, S. 38). Die Veränderungen der pathophysiologischen Größen (ΔPAP , ΔVP und ΔW) in LPS-stimulierten Rattenlungen erreichten – wie unter 4.3.1 beschrieben – bei maximaler evaluierter Inhibitorkonzentration ($40 \mu\text{M}$ U 1026) annähernd das Niveau unstimulierter Lungen. In Korrelation hierzu zeigte sich kein signifikanter Unterschied der TxB_2 -Konzentration zwischen LPS-stimulierten und unstimulierten Versuchsgruppen bei maximaler Inhibitorkonzentration. Die Liberation von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ blieb sowohl während der zweistündigen Versuchsdauer vor Zugabe der AA als auch nach deren Applikation von der MEK1/2-Inhibition unberührt, da sich zu den Zeitpunkten $t=120'$ und $t=125'$ keine signifikanten Differenzen der Konzentrationen von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ der Inhibitorgruppen im Vergleich zu den Kontrollexperimenten mit und ohne Zugabe von Endotoxin ergaben (s. Abb. 16 und 17, S. 38).

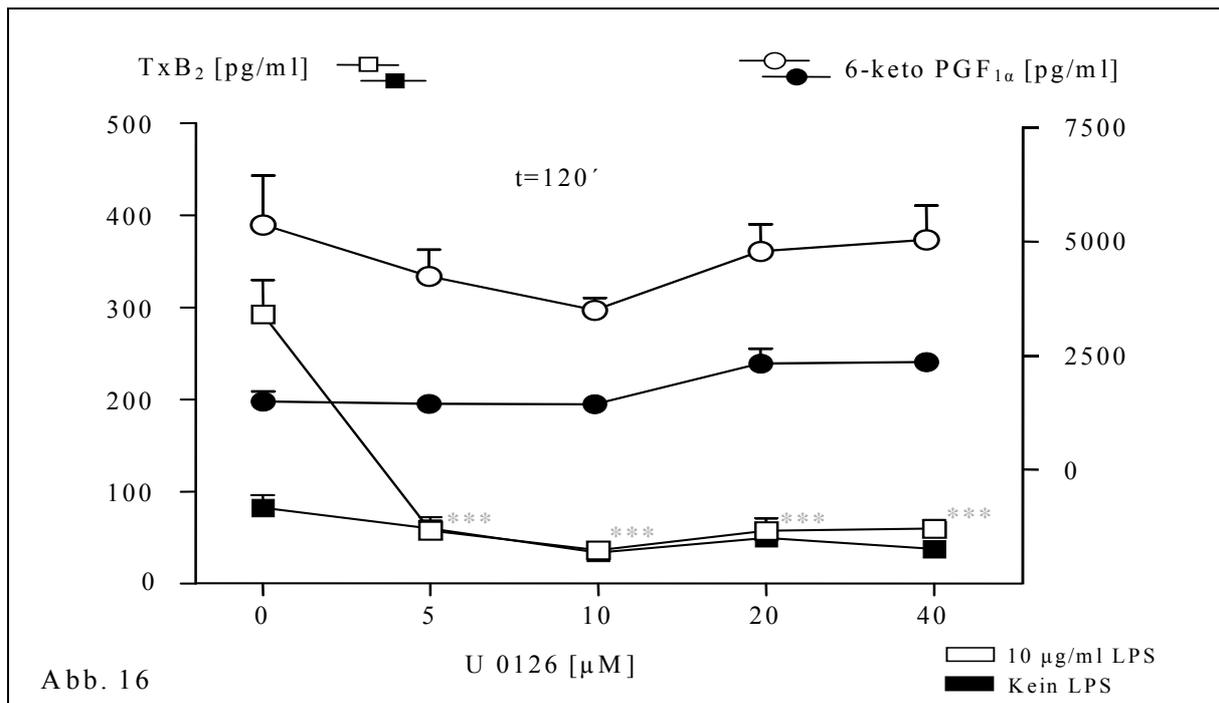


Abb. 16 und 17: Darstellung der dosis-abhängigen Verminderung der TxB_2 -Liberation LPS-stimulierter und unstimulierter Rattenlungen durch MEK1/2-Inhibition (U 0126) zum Zeitpunkt $t=120'$ unmittelbar vor AA-Applikation [s. oben] und $t=125'$ 5 Minuten nach AA-Zusatz [s. unten]. Die MEK1/2-Inhibition hat keine Auswirkungen auf die Liberation von TxB_2 in unstimulierten Rattenlungen. Die Synthese von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ bleibt von der MEK1/2-Inhibition ebenfalls unberührt. Der zeitliche Verlauf der Prostanoidliberation von TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ über die ersten zwei Stunden Versuchsdauer ist in den Abb. 20 und 21 im Anhang (s. S. 71 und 72) dargestellt. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) = signifikante Differenz der MW der Konzentration von TxB_2 der U 0126-inhibierten Versuchsgruppen im Vgl. zu Kontrollgruppen ohne Inhibitorzusatz.

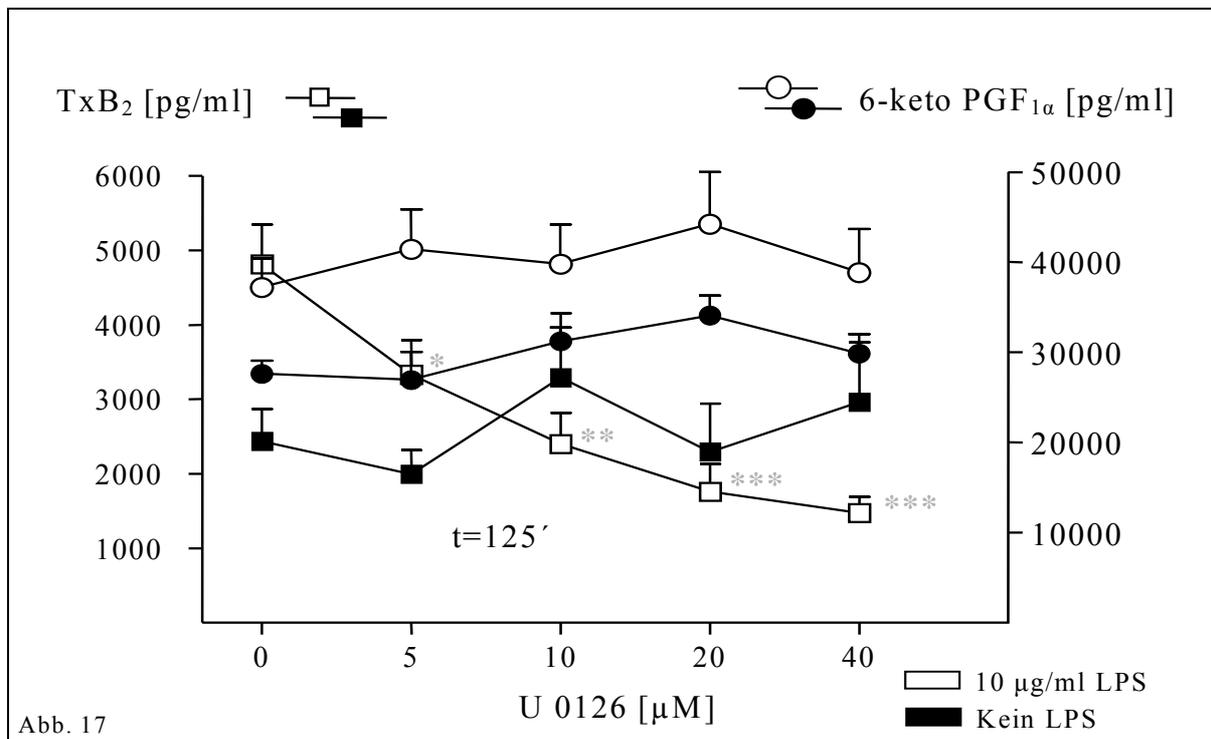


Abb. 17

5 Diskussion

5.1. Diskussion der Ergebnisse der Kontrollexperimente mit und ohne LPS-Stimulation

Während der ersten beiden Versuchsstunden traten keine wesentlichen Veränderungen der Parameter PAP, VP und W in den Kontrollexperimenten sowohl mit als auch ohne LPS-Gabe auf. Diese Beobachtung korreliert mit vorangegangenen Arbeiten (Walmrath et al., 1994; Schütte et al., 1997; Delong et al., 1999), in denen rezirkulierendes LPS in blutfrei perfundierten Kaninchen- und Rattenlungen keine Veränderungen der funktionellen Variablen wie pulmonalarterieller Druck, Beatmungsdruck und Organgewicht hervorgerufen hat. In LPS-stimulierten Kontrollgruppen wurden während der 120-minütigen „Priming“-Phase statistisch signifikant höhere Konzentrationen von TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ im Vergleich zu unstimulierten Experimenten gemessen (s. Abb. 5 S. 29). Bei ausbleibender funktioneller Veränderung der Messwerte für PAP, VP und W scheint sich die vermehrte Liberation des vaso- und bronchokonstriktorisches TxA_2 und des vasodilatierenden PGI_2 unter Berücksichtigung der Beeinflussung durch andere vasoaktive und bronchodilatierende Substanzen unter „baseline“-Bedingungen zu kompensieren. Sowohl in LPS-stimulierten als auch unstimulierten Lungen provozierte die AA-Applikation nach zwei Stunden eine Elevation des pulmonalarteriellen Druckes, des Ventilationsdruckes und des Organgewichtes als Ausdruck des Konzentrationsanstiegs von TxA_2 . Die Veränderungen der Parameter in LPS-stimulierten im Vergleich zu unstimulierten Organen war als Folge des „Priming“-Phänomens beachtlich amplifiziert und statistisch hochsignifikant (Δ PAP 3-fach erhöht, Δ [Δ VP] 2,2 mmHg, Δ [Δ W] 5 g, Konzentration TxB_2 2-fach erhöht) (s. Abb. 4, S. 28 u. Abb. 5, S. 29). Die AA-Gabe hatte in LPS-stimulierten Lungen den Funktionsverlust des Organs zur Folge, wohingegen in unstimulierten Rattenlungen die messbaren Variablen zu den Ausgangswerten ($t=120'$ vor AA-Gabe) zurückkehrten und repetitive AA-Applikationen mit weitgehender Intaktheit des Organs durchgeführt werden konnten (Ermert L. et al., 1998a). Die beschriebenen pathophysiologischen Reaktionen in den Kontrollexperimente und deren Augmentation durch LPS waren reproduzierbar und sind durch zahlreiche Untersuchungen an isolierten Ratten- (Ermert et al., 1998a; Ermert et al., 2000c) und Kaninchenlungen (Walmrath et al., 1994; Schütte et al., 1997; Streudel et al., 1997) belegt.

TxA_2 ist als potenter Vaso- und Bronchokonstriktor der pulmonalen Strombahn bekannt (Holtzman 1991; Schütte et al., 1997; Dogne et al., 2006; Allen et al., 2006). Dass Thromboxan entscheidend an der LPS-induzierten Pathogenität im verwendeten Tiermodell

beteiligt ist, belegt die Tatsache, dass eine komplette, selektive Inhibition der Cox-2 in Rattenlungen zur kompletten Nihilierung der LPS-vermittelten pathophysiologischen Veränderung führte, und hiermit einhergehend verminderte Konzentrationen von TxA_2 gemessen werden konnten, wobei die Liberation von vasodilatierendem PGI_2 von der Cox-2-Hemmung unbeeinflusst blieb (Ermert et al., 2000c). In vergleichbaren Untersuchungen mit LPS-stimulierten Rattenlungen konnte durch eine selektive Blockade des Thromboxanrezeptors ebenfalls eine völlige Aufhebung der LPS-induzierten vaskulären Hyperreagibilität erzielt werden (Held und Uhlig, 2000). Zu der Augmentation der pathophysiologischen Parameter nach Gabe von LPS passend, zeigte sich in vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe im immunhistochemischen Vergleich LPS-stimulierter und unstimulierter Rattenlungen eine endotoxin-induzierte Hochregulation der Cox-2 und TxA_2 -Synthase besonders in glatten Muskelzellen der kleinen pulmonalen Widerstandsgefäßen, bronchialen glatten Muskelzellen und eine „De novo“-Synthese in Endothelzellen, wobei durch die Kolo-kalisation beider Enzyme eine funktionelle Kopplung vorzuliegen scheint (Ermert et al., 2000a; Ermert et al., 2000b). Der Erhöhung des Ventilationsdruckes nach AA-Exposition liegt deshalb bei Annahme der Expressionsinduktion der Cox-2 in bronchialen Muskelzellen und der vermehrten Generierung von TxA_2 eher eine Elevation der pulmonalen Resistance durch Bronchokonstriktion als eine Abnahme der Lungencompliance als Folge des massiven alveolären Ödems zugrunde, zumal die Steigerung des Ventilationsdruckes sehr rasch eintrat und der Gewichtszunahme voranging.

Die Konzentration des 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ im Perfusat ($t=125'$) zeigte nach AA-Gabe ebenfalls einen steilen und statistisch signifikanten Anstieg im Vergleich zum Zeitpunkt $t=120'$ sowohl in LPS-stimulierten als auch unstimulierten Rattenlungen, war in LPS-stimulierten Versuchen im Vergleich zu unstimulierten Experimenten ($t=125'$) aber nicht statistisch signifikant erhöht. Vor AA-Applikation zum Zeitpunkt $t=120'$ lag jedoch eine statistisch signifikante Differenz der Konzentrationen von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ zwischen beiden Gruppen zugunsten einer vermehrten Synthese in LPS-exponierten Organen vor (s. Abb. 5, S. 29).

In den bisherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe war die Liberation von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ in der Rattenlunge nahezu vollständig Cox-1-vermittelt, da eine selektive Cox-2-Inhibition keinen Einfluss auf die Liberation von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ ausübte, und die LPS-Stimulation in den quantitativen immunhistochemischen Untersuchungen keine Auswirkung auf die Expression der Cox-1 hatte (Ermert et al., 1998a; Ermert et al., 2000c; Ermert et al., 2000b). Somit liegt der im Versuchsverlauf zunehmende Konzentration von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ keine Induktion der COX-1 zugrunde. Vielmehr könnte eine vermehrte Rekrutierung der

COX-1-Substrate aus zellulären Depots mit konsekutiver Bildung von PGI₂ während der ersten 120 Minuten Versuchsdauer als Gegenreaktion auf die zunehmende TXA₂-Liberation durch COX-2-Induktion vorliegen. Dieser Kompensationsversuch wird nach Substratgabe (AA bei 120') erschöpft, da sich im Gegensatz zu TXB₂ keine signifikant erhöhte Liberation von 6-keto PGF_{1α} zum maßgeblichen Zeitpunkt t=125' im Vergleich zwischen den beiden Kontrollgruppen (+/- LPS) zeigte. Studien an anderen Organen und Spezies postulieren durchaus ein Cox-2-generierte PGI₂-Synthese (Tegeder et al., 2000; Caughey et al., 2001), die in unserem Organmodell aber nicht vorzuliegen scheint.

Die als pathophysiologisches Korrelat des „Priming“-Mechanismus detektierte Amplifizierung der veränderlichen Variablen PAP, VP und W durch LPS nach AA-Gabe sind somit maßgeblich TxA₂-abhängig und Cox-2-vermittelt (Ermert et al., 2000c). Trotz der rasanten gleichzeitigen Erhöhung vasokonstringierender und vasodilatierender Prostanoiden scheint zudem die starke gefäßtonisierende Wirkung des Thromboxans die Potenz der Vasodilatoren zu übertreffen (Seeger et al., 1982; Ermert et al., 1998a) und die LPS-vermittelte Hochregulation der Cox-2/Thromboxan-Synthase das Gleichgewicht der vasokonstringierender (vor allem Thromboxan) und vasodilatierender Prostanoiden (z.B. PGI₂) zugunsten des Thromboxans zu verschieben.

Der raschen Ödemformation mit Zunahme des Organgewichtes in LPS-stimulierten Rattenlungen könnten zwei Mechanismen zugrunde liegen. Einerseits erhöht AA unabhängig von einer möglichen Modifikation des mikrovaskulären Filtrationsdruckes durch Generierung von Lipoxygenaseprodukte die pulmonale Gefäßpermeabilität (Townesley et al., 1985; Seeger et al., 1986; Grimminger et al., 1991; Koch et al., 1992). Andererseits rekrutiert Thromboxan als AA-Produkt postkapilläre Gefäße (Selig et al., 1986; Yoshimura et al., 1989; Shibamoto et al., 1995) und steigert folglich den Filtrationsdruck im kapillären Gefäßbett. Letzterer Sachverhalt würde gut die Beobachtung vorangegangener Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Ermert et al., 2000c; Ermert et al., 1998a) erklären, dass eine selektive Inhibition der Cox-2 die Gewichtszunahme durch Flüssigkeitssequestration sowohl in LPS-stimulierten als auch unstimulierten Rattenlungen unterbindet. Quantitative immunhistochemische Studien zeigen zudem, dass die Cox-2 prädominant in kleinen, prä- und vor allem postkapillären Gefäßen exprimiert wird (Ermert et al., 1998b). Somit scheint der Anstieg des Organgewichtes als Folge der interstitiellen und alveolären Wassereinlagerung vorwiegend vasoaktiver Natur zu sein.

5.3 Diskussion der Ergebnisse der p38-Inhibition

Die Aktivierung der p38-MAPK durch zweifache Phosphorylierung ist der finale Schritt in einer Signaltransduktionskaskade, die in die Regulation unterschiedlichster proinflammatorischer Zytokine involviert ist und Einfluss auf die Regulation induzierbarer Enzyme wie der Cox-2 hat. Der p38-Inhibitor SB 203580 verminderte in den verwendeten, auch in anderen Studien erfolgreich eingesetzten Konzentrationen von 1-20 μM (Cuenda et al., 1995; Kumar et al., 1999; Chen et al., 1999), statistisch signifikant den Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes, des Ventilationsdruckes und die Zunahme des Organgewichtes bis zur dosisabhängigen kompletten Unterdrückung der AA-induzierten pathophysiologischen Veränderungen in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen (s. Abb. 6 u. 7, S. 31). Parallel zur zunehmenden Inhibitorkonzentration zeigte sich eine signifikante Abnahme der TxA_2 -Liberation um den Faktor 12 (bzw. 8) in LPS-stimulierten (unstimulierten) Lungen bei maximaler Inhibition (s. Abb. 11, S. 33). Dasselbe gilt für den nur in LPS-stimulierten Lungen eingesetzten p38-Inhibitor SC 68376 (s. Abb. 8. u. 9, S. 31 und Abb. 13, S.34), wobei die maximale Inhibitorkonzentration bis zur kompletten Unterdrückung von ΔPAP , ΔVP und ΔW hier nicht evaluiert wurde. Die selektive Inhibition von p38, insbesondere der Isoformen p38 α und p38 β , durch SB 203580 wurde in mehreren Arbeiten gezeigt (Cuenda et al., 1995; Lee et al., 1999).

Die Cox-2/Thromboxan-Synthase wurde bereits zuvor als essentieller Mechanismus der vaskulären und bronchialen Tonusregulation unter physiologischen und inflammatorischen Bedingungen identifiziert (Ermert et al., 1998a; Ermert et al., 2000c). Die Ergebnisse der p38-Inhibition in unstimulierten Versuchsgruppen belegen eine zentrale Rolle der p38-MAPK an dieser Cox-2/Thromboxan-Synthase-abhängigen Regulation des pulmonalen Vaso- und Bronchotonus unter physiologischen Bedingungen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die p38-MAPK bei LPS-induzierter Inflammation eine zentrale Schlüsselfunktion in der Hochregulation des Cox-2/Thromboxan-Synthase-Effektorsystems einnimmt.

Die p38-Inhibition hatte keine Auswirkungen auf die Generierung von vasodilatierendem PGI_2 , da sich sowohl in den LPS-stimulierten als auch unstimulierten Versuchsgruppen mit Inhibitorangabe kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Konzentration von 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ in den Perfusatanalysen im Vergleich zu den Kontrollexperimenten zu den verschiedenen Zeitpunkten zeigte (s. Abb. 10-13, S. 33 und 34). Somit unterliegt die Liberation von PGI_2 nicht der Regulation durch die p38-MAPK. Dies untermauert bei Annahme der maßgeblichen Einflussnahme der p38-MAPK auf die Cox-2-Expression und

fehlender Auswirkung auf die Cox-1-Regulation die Vermutung der vorwiegend Cox-1-abhängigen PGI₂-Synthese in Rattenlungen.

Untersuchungen an Zellkultur- und Organmodellen bestätigen das Resultat der maßgeblichen Einflussnahme der p38-MAPK sowohl an der Hochregulation der Cox-2 nach LPS-Stimulation (Grishin et al., 2006; Nagano et al., 2002; Chen et al., 1999; Hwang et al., 1997) als auch an der Expressions- und Aktivitätssteuerung der Cox-2 unter physiologischen Kautelen (Cheng und Harris, 2002; Wu et al., 2006). Weiterhin konnte die inflammatorische Induktion der p38-MAPK und NFκB mit konsekutiver Induktion der Cox-2 in Abwesenheit von LPS durch Inkubation isolierter humaner Atemwegsepithelien mit *Streptococcus pneumoniae* gezeigt werden (N'Guessan et al., 2006). Weitere „in-vitro“-Studien an humanen Monozyten und Karzinomzelllinien zeigen zudem, dass die p38-MAPK die Cox-2-mRNA stabilisiert und eine p38-Inhibition eine rasche Destabilisierung derselben zur Folge hat (Duque et al., 2006; Lasa et al., 2000; Dean et al., 1999). Immunhistochemische Analysen unserer Arbeitsgruppe belegen eine konstitutive Expression der p38-MAPK in unstimulierten Rattenlungen in fast allen pulmonalen Zelltypen. Die aktivierte, zweifach phosphorylierte Form der p38-MAPK (p-p38) kommt unter physiologischen, nicht-inflammatorischen Bedingungen vor allem in Bronchialepithel-, Gefäßendothel- und glatten Muskelzellen der kleinen pulmonalen Widerstandsgefäße vor. In den glatten Muskelzellen der Bronchien wird dagegen keine p-p38-MAPK gefunden. Eine Neuinduktion von p-p38 als Antwort auf die LPS-Stimulation wird vor allem in glatten Muskelzellen der Bronchien und eine weitere Erhöhung der p-p38-Expression in glatten Muskelzellen der kleinen pulmonalen Widerstandsgefäße gefunden (Ermert et al., 2003).

Die konstitutive Expression von p-p38 in den glatten Muskelzellen der kleinen pulmonalen Widerstandsgefäße bei fehlender LPS-Stimulation korreliert gut mit der Beobachtung der dosisabhängigen Blockade der pulmonalarteriellen Druckantwort durch p38-Inhibition in unstimulierten Rattenlungen und legt einen maßgeblichen Einfluss der p38-MAPK an der Regulation der Cox-2/Thromboxan-Synthase unter physiologischen Bedingungen nahe. Entsprechend zeigte sich bei der Messung der Prostanoidliberation vor AA-Applikation zum Zeitpunkt t=120' in p38-inhibierten unstimulierten Organen eine dosisabhängige, statistisch signifikante Verminderung der TxB₂-Konzentration (s. Abb. 10, S. 33).

Die Erhöhung der p-p38-Aktivität in den Gefäß- und Bronchustonus regulierenden Zellen durch LPS-Stimulation begleitet die Amplifizierung der pathophysiologischen Parameter ΔPAP, ΔVP und ΔW im Vergleich zu unstimulierten Organen, und die immunhistochemische Detektion in den maßgeblichen Zielzellen der Rattenlunge korreliert

hervorragend zur beobachteten kolokalisierten Hochregulation der Cox-2/Thromboxan-Synthase (Ermert et al., 2000a; Ermert et al., 2000b). Beide Aussagen, die Beobachtung der konstitutiven und LPS-induzierbaren Expression, stützten die Erkenntnis dieser Arbeit des maßgeblichen Einflusses der p38-MAPK auf die Regulation der Cox-2/Thromboxan-Synthase sowohl unter physiologischen als auch unter inflammatorischen Bedingungen.

In Zellkulturversuchen an humanen Chondrozyten ist p38 in ausdifferenzierten Zellen nicht durch LPS induzierbar, liegt aber konstitutiv in aktivierter Form vor. In juvenilen, proliferierenden Knorpelzellen hingegen gelingt die p38-Induktion mittels Endotoxin bei fehlen einer konstitutiven Expression (Ulivi et al., 2008). Möglicherweise spielt die Bradytrophie des ausdifferenzierten chondralen Gewebes eine Rolle bei der ausbleibenden Induzierbarkeit der p38-MAPK durch LPS.

5.4 Diskussion der Ergebnisse der ERK1/2-Inhibition

Der MEK1/2-Inhibitor U 0126 hatte in unstimulierten Versuchsgruppen keine Auswirkungen auf die Veränderungen von PAP, VP, W und der Konzentrationen von TxB₂ und 6-keto PGF_{1α} sowohl vor als auch nach AA-Gabe (s. Abb. 14 u. 15, S. 36 + Abb. 16 und 17, S. 38). Die ERK1/2-MAPK scheint daher, anders als die p38-MAPK, nicht in die Vaso- und Bronchotonusregulation unter physiologischen Bedingungen involviert zu sein. Wahrscheinlich wird die ERK1/2 in den für die AA-induzierten pathophysiologischen Veränderungen maßgeblichen Zielzellen (glatte Muskelzellen der pulmonalen Widerstandsgefäße, glatte Bronchialmuskelzellen) unter physiologischen Bedingungen nicht exprimiert oder liegt inaktiv (nicht-phosphoryliert) vor. Immunhistochemische Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigen eine konstitutive Expression von ERK1 und ERK2 in fast allen pulmonalen Zelltypen. Die aktivierte, zweifach phosphorylierte Form der ERK-MAPK (p-ERK) kommt physiologisch dagegen nur in Endothel-, Bronchialepithelzellen und Alveolarmakrophagen vor. Somit liegt in den maßgeblichen Zielzellen lediglich eine konstitutive Expression der inaktiven, nicht-phosphorylierten ERK1/2 vor. p-ERK findet sich in den glatten Muskelzellen der Bronchien und der pulmonalen Widerstandsgefäße in unstimulierten Rattenlungen nicht (Ermert et al., 2003). Dieser Sachverhalt erklärt hinreichend die fehlende Auswirkung der MEK1/2-Inhibition in den Experimenten unter nicht-inflammatorischen Bedingungen.

LPS-stimulierte Rattenlungen zeigten unter MEK1/2-Hemmung eine signifikante dosisabhängige Reduktion von Δ PAP, Δ VP, Δ W und der Konzentration von TxB₂ nach AA-Applikation. Mit steigender Inhibitorkonzentration erreichte die Suppression der Messparameter wieder die Basiswerte unstimulierter Lungenversuche (s. Abb. 14 u. 15, S. 36 + Abb. 16 und 17, S. 38). In den immunhistochemischen Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich nach LPS-Stimulation eine Expressionszunahme von p-ERK in Endothel-, Bronchialepithelzellen und Alveolarmakrophagen und eine Neuinduktion der aktivierten ERK in glatten Muskelzellen der kleinen pulmonalen Widerstandsgefäße (Ermert et al., 2003). Dabei scheint vor allem die ERK2 die dominante Isoform zu sein, welche das LPS-Signal als Teil der Signaltransduktionskaskade vermittelt und zur erhöhten Cox-2-abhängigen Thromboxanliberation führt (Eligini et al., 2002). Die ERK-Aktivierung wird in den maßgeblichen Zielzellen (glatte Gefäßmuskelzellen), welche die thromboxan-vermittelte pulmonalarterielle Druckerhöhung und Gewichtszunahme triggern, durch LPS-Applikation induziert.

Somit begleitet die Neuinduktion von p-ERK in den Gefäßtonus regulierenden Zellen durch LPS-Stimulation die Amplifizierung der pathophysiologischen Parameter Δ PAP und Δ W durch Endotoxin im Vergleich zu unstimulierten Rattenlungen. Die Neuinduktion scheint wie im Falle der p-p38-MAPK der Hochregulation der Cox-2/Thromboxan-Synthase (Ermert et al., 2000a; Ermert et al., 2000b) vorauszugehen bzw. diese Hochregulation zu vermitteln, zumal - ähnlich wie bei der p38-MAPK - eine Kolo-kalisation der neuinduzierten p-ERK und der hochregulierten Cox-2/Thromboxan-Synthase vorliegt.

Wie auf S. 44, Abs. 3 beschrieben, könnte der AA-induzierten Gewichtszunahme der Rattenlunge unter inflammatorischen Bedingungen und der folgenden interstitiellen und alveolären Ödemformation als maßgeblichem Mechanismus die thromboxan-vermittelte Tonuserhöhung postkapillärer Widerstandsgefäße mit konsekutiver Erhöhung des kapillären Filtrationsdruckes und vermehrter Flüssigkeitssequestration zugrunde liegen (Selig et al., 1986; Yoshimura et al., 1989; Shibamoto et al., 1995). Andererseits scheint die ERK1/2-MAPK auch direkten Einfluss auf die Gefäßpermeabilität auszuüben (Breslin et al., 2003; Yu et al., 2005) und so die LPS-induzierte Ödembildung beeinflussen zu können. Die Unterdrückung der Gewichtszunahme durch MEK1/2-Inhibition, folglich fehlender Hochregulation der Cox-2/Thromboxan-Synthase mit verminderter TxA₂-Liberation, unterstützt die Vermutung der vorwiegend druckinduzierten, thromboxan-vermittelten Ödembildung.

Die MEK1/2-Inhibition verminderte signifikant den LPS-induzierten Anstieg des Ventilationsdruckes. Untersuchungen zur zellulären Expression der aktivierten ERK1/2 demonstrieren diskrepante Ergebnisse. Unsere Arbeitsgruppe zeigte immunhistochemisch ein Vorliegen der p-ERK in bronchialen Endothelzellen aber nicht in den glatten Muskelzellen der Bronchien unter inflammatorischen Bedingungen. In verschiedenen Zellkulturuntersuchungen an humanen glatten bronchialen Muskelzellen konnte p-ERK dagegen induziert werden (Chen und Khalil 2006; Rahman et al., 2006). Möglicherweise könnte die Bronchokonstriktion auch parakrin vermittelt werden, oder die Diskrepanz ergibt sich aus den unterschiedlichen methodischen Ansätzen.

Die MEK1/2-Inhibition hatte keinen Einfluss auf die Liberation von vasodilatierendem PGI₂, da sich sowohl in LPS-stimulierten als auch unstimulierten Versuchsgruppen mit Inhibitorengabe kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Konzentration von 6-keto PGF_{1α} in den Perfusatanalysen im Vergleich zu den Kontrollexperimenten zu den verschiedenen Zeitpunkten zeigte (s. Abb. 16 und 17, S. 38). Somit scheint die Liberation von PGI₂ nicht der maßgeblichen Regulation durch die ERK1/2 zu unterliegen und -ähnlich wie bei der p38-MAPK- bei Annahme der exklusiven PGI₂-Synthese via COX-1 in der Rattenlunge eine vorwiegende Einflussnahme auf die COX-2 zu bestehen.

Die Ergebnisse der MEK1/2-Inhibition durch U 0126 mit konsekutiver fehlender Aktivierung der MAPK ERK1/2 durch ausbleibende Phosphorylierung verdeutlichen, dass die ERK1/2 neben der p38-MAPK maßgeblich an der Regulation der LPS-Signaltransduktion beteiligt ist. Sie wird ebenfalls durch die LPS-Applikation aktiviert und hat einen entscheidenden Einfluss auf die endotoxin-vermittelte Pathogenität im verwendeten Tiermodell. Im Unterschied zur p38-MAPK hat die ERK1/2-MAPK keine Auswirkungen auf die Veränderung der messbaren Parametern in unstimulierten Experimenten. Hierfür scheint die fehlende Aktivierung durch Phosphorylierung in den maßgeblichen Zellen unter physiologischen Bedingungen verantwortlich zu sein.

5.5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist es, in einem etablierten ex-vivo Versuchsmodell der isoliert perfundierten Rattenlunge die endotoxin-vermittelten Organtoxizitäten und Auswirkungen auf das Cox-2/Thromboxan-Synthase-Effektorsystem zu beleuchten, wobei die zwei MAPK p38 und ERK als möglicherweise entscheidende Regulatorproteine untersucht wurden.

Der Vergleich der durchgeführten Kontrollexperimente ohne und mit Gabe von LPS verdeutlicht eindrucksvoll den schon zuvor gezeigten „Priming“-Effekt, der sich in einer vielfach amplifizierten Antwort auf einen sekundären inflammatorischen Stimulus ausdrückte. Beide MAPK, p38 und ERK1/2, sind an der Signaltransduktion von LPS im etablierten, septischen Tiermodell beteiligt und deren Inhibition zeigte einen protektiven Einfluss auf die Intaktheit des explantierten Organs im Versuchsverlauf. Als pathophysiologisches Korrelat dieses protektiven Mechanismus vermindern beide MAPK-Inhibitoren dosisabhängig und statistisch signifikant die Augmentation der messbaren pathophysiologischen Parameter PAP, VP und W und die erhöhte Liberation des Prostanoids TxB_2 (als Metabolit von TxA_2), welches das maßgebliche pathogene Substrat im untersuchten Organmodell darstellt. Die p38-MAPK vermittelt dies in allen Inhibitorexperimenten (+/- LPS) und hat somit starken Einfluss auf die Regulation des Cox-2/Thromboxan-Synthase-Effektorsystems sowohl unter physiologischen als auch inflammatorischen Bedingungen. Die Inhibition der p38-MAPK vermag die pathophysiologischen Veränderungen nach Applikation der Arachidonsäure nahezu komplett zu unterdrücken.

Die ERK1/2-MAPK dagegen hat nur unter inflammatorischen Bedingungen messbare Auswirkungen und scheint unter physiologischen Kautelen die Regulation des Cox-2/Thromboxan-Synthase-Effektorsystems nicht zu berühren.

Beide MAPK stellen somit interessante Zielproteine für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien bei septischer Lungenerkrankung dar. Die Inhibition der MEK1/2- und ERK1/2-MAPK vorgeschalteter membranständiger Rezeptoren (z.B. EGFR, VEGFR) und derer Aktivatoren (z.B. EGF, VEGF) ist bereits Standard in der humanen antineoplastischen Therapie. Eine direkte Inhibition der p38- und ERK1/2-MAPK hat bis dato keinen Einzug in die medikamentöse Therapie gefunden, stellt aber weiterhin eine für die Zukunft vielversprechende Option dar und ist Gegenstand der gegenwärtigen pharmazeutischen Forschung. Die ERK1/2- und p38-Inhibition hat keinen Einfluss auf die Liberation von vasodilatierendem PGI_2 . Die PGI_2 -Synthese scheint nicht der Regulation durch die p38- und ERK1/2-MAPK zu unterliegen und Cox-1-vermittelt zu sein.

5.6 Summary

The present study examines the LPS-induced organ toxicity and its influence on the cyclooxygenase-2/thromboxan-synthase effector system in a buffer-perfused isolated rat lung. Especially the two MAPK p38 and ERK1/2, which may play an essential role in LPS signaling events, were regarded.

Comparison of the control experiments (+/- LPS) reveals a huge augmentation of the pathophysiological changes (“priminig” effect) in LPS-stimulated lungs.

In our model of septic lung disease, both MAPK, p38 and ERK1/2, are involved in the downstream enzyme cascade of LPS and are able to prevent lungs from heavy organ failure. Both inhibitors reduce the responsiveness to a subsequent inflammatory stimulus in a dose-dependent manner by decreasing the pathophysiological changes of PAP, VP and W and the markedly enhanced liberation of TXB₂. TXB₂ is the stable product of TXA₂ metabolism, which seems to be the decisive pathogen substrate in these experiments. The p38-MAPK influences all inhibitor experiments (+/- LPS). Therefore, it has an important capacity of regulating the cyclooxygenase-2/thromboxan-synthase effector system under physiological and inflammatory conditions. Its inhibition is able to abolish the pathophysiological changes almost completely.

However the ERK1/2-MAPK only has measurable consequences in inflammation status and the cyclooxygenase-2/thromboxan-synthase axis is not affected under physiological conditions.

Both MAPK are interesting proteins for future therapeutic strategies in septic lung disease. Presently, the inhibition of cell surface regulating receptors of MEK1/2- and ERK1/2-MAPK (such as EGFR, VEGFR) and their soluble activators (such as EGF, VEGF) is already established in human antineoplastic therapy. Considerations of direct inhibition of the p38- and ERK1/2-MAPK have not recently reached clinical routine, but seem to be a promising future option and are object of the present pharmacological research.

The ERK1/2- and p38-inhibition does not influence the liberation of vasodilating PGI₂. The regulation of PGI₂ synthesis seems to be independent from the p38- and ERK1/2-MAPK pathway and is mediated by Cox-1.

6 Literaturverzeichnis:

1. Adjei A.A.. Novel combinations based on epidermal growth factor receptor inhibition. *Clin. Cancer. Res.* 12: 4446-50. Review. 2006.
2. Allen I.C., Hartney J.M., Coffman T.M., Penn R.B., Wess J., und Koller B.H.. Thromboxane A₂ induces airway constriction through an M₃ muscarinic acetylcholine receptor-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290: 526-33, 2006.
3. Arbour N.C., Lorenz E., und Schutte B.C.. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat. Genet.*, 25: 187-91, 2000.
4. Asaduzzaman M., Wang Y., und Thorlacius H.. Critical role of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in septic lung injury. *Crit. Care Med.* 36: 482-8, 2008.
5. Bao W., Behm D.J., Nerurkar S.S., Ao Z., Bentley R., Mirabile R.C., Johns D.G., Woods T.N., Doe C.P., Coatney R.W., Ohlstein J.F., Douglas S.A., Wilette R.N., und Yue T.L.. Effects of p38 MAPK inhibitor on angiotensin II-dependent hypertension, organ damage, and superoxide anion production. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 49: 362-8, 2007.
6. Branger J., van den Blink B., Weijer S., Gupta A., van Deventer S.J., Hack C.E., Peppelenbosch M.P., und van der Poll T. Inhibition of coagulation, fibrinolysis, and endothelial cell activation by a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia. *Blood* 101: 4446-8, 2003.
7. Breslin J.W., Pappas P.J., Cerveira J.J., Hobson R.W., und Duran W.N.. VEGF increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving ERK-1/2 and nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: 92-100, 2003.

8. Carlin C.M., Peacock A.J., and Welsh D.J.. Fluvastatin inhibits hypoxic proliferation and p38 MAPK activity in pulmonary artery fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 37: 447-56, 2007.
9. Caughey G.E., Cleland L.G., Penglis P.S., Gamble J.R., and James M.J.. Roles of cyclooxygenase COX-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J. Immunol.* 167: 2831-8, 2001.
10. Chen B.C., Chen Y.H., and Lin W.W.. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide induced iNOS and Cox-2 expression in J774 macrophages. *Immunology* 97:124-9, 1999.
11. Chen G., and Khalil N.. TGF-beta1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases. *Respir. Res.* 3: 7-12, 2006.
12. Cheng H.F., and Harris R.C.. Cyclooxygenase-2 expression in cultured cortical thick ascending limb of Henle increases in response to decreased extracellular ionic content by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Role of p38-mediated pathways. *J. Biol. Chem.* 277:45638-43, 2002.
13. Clark J.E., Sarafraz N., and Marber M.S.. Potential of p38-MAPK inhibitors in the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacol. Ther.* 116: 192-206, 2007.
14. Cobb M.H., Goldsmith E.J.. How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* 270: 14843-46, 1995.
15. Cuenda A., Rouse J., Doza Y.N., Meier R., Cohen P., Gallagher T.F., Young P.R., and Lee J.C.. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 364: 229-33, 1995.

16. Dauphinee S.M., und Karsan A..Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab. Invest.* 86: 9–22, 2006.
17. Da Silva Correia J., Soldau K., Christen U., Tobias P.S., und Ulevitch R.J.. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. *J. Biol. Chem.* 276: 21129–35, 2001.
18. Da Silva Correia J., und Ulevitch R.J.. MD-2 and TLR4 N-Linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J. Biol. Chem.* 277: 1845–54, 2002.
19. Dean J.L.E., Brook M., Clark A.R., und Saklatvala J.. p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 265-9, 1999.
20. Delong P., O’Sullivan M.G., Huggins E., Hubbard C.L., und McCall C.. Bacterial lipopolysaccharide induction of the prostaglandin G/H synthase 2 causes thromboxan-dependent pulmonary hypertension in rabbits. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20: 493-9, 1999.
21. DeWitt D.L.. Prostaglandin endoperoxidase synthetase: Regulation of enzyme expression. *Biochem. Biophys. Acta.* 1083: 121-34, 1991.
22. Dogne J.M., Hanson J., de Leval X., Pratico D., Pace-Asciak C.R., Drion P., Pirotte B., und Ruan K.H.. From the design to the clinical application of thromboxane modulators. *Curr. Pharm. Des.* 12: 903-23, 2006.
23. Dominguez C., Powers D.A., und Tamayo N.. P38 MAP kinase inhibitors: many are made, but few are chosen. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 8: 421-30. Review. 2005.
24. Duque J., Diaz-Munoz M.D., Fresno M., und Iniguez M.A.. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1beta in colon carcinoma cells. *Cell. Signal* 18: 1262-9, 2006.

25. Eligini S., Brambilla M., Banfi C., Camera M., Sironi L., Barbieri S.S., Auwerx J., Tremoli E., und Colli S.. Oxidized phospholipids inhibit cyclooxygenase-2 in human macrophages via nuclear factor-kappaB/IkappaB- and ERK2-dependent mechanisms. *Cardiovasc. Res.* 55: 406-15, 2002.
26. Ermert L., Ermert M., Althoff A., Merkle M., Grimminger F, und Seeger W. Vasoregulatory prostnoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in noninflamed rat lungs. *JPET* 286: 1309-14, 1998a.
27. Ermert L., Ermert M., Goppelt-Struebe M., Walmrath D., Grimminger F., Streudel W., Ghofrani H.A., Homberger C., Duncker H.R., und Seeger W.. Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18: 479-88, 1998b.
28. Ermert L., M. Ermert, H.-R. Duncker, F. Grimminger, und W. Seeger. In situ localization and regulation of thromboxane A(2) synthase in normal and LPS-primed lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278: 744-53, 2000a.
29. Ermert L., Ermert M., Merkle M., Gobbelt-Struebe M., Duncker H.-R., Grimminger F., und Seeger W. Rat pulmonary cyclooxygenase-2 expression in response to endotoxin challenge: differential regulation in the various types of cells in the lung. *Am. J. Pathol.* 156: 1275-87, 2000b.
30. Ermert M., Merkle M., Mootz R., Grimminger F., Seeger W., und Ermert L.. Endotoxin priming of the cyclooxygenase-2-thromboxane axis in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 278: 1195-1203, 2000c.
31. Ermert M., Ruppert C., Gunther A., Duncker H.R., Seeger W., und Ermert L.. Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab. Invest.* 82: 425-41, 2002.

32. Ermert M., Kuttner D., Eisenhardt N., Dierkes C., Seeger W., und Ermert L.. Cyclooxygenase-2–dependent and thromboxane-dependent vascular and bronchial responses are regulated via p38 mitogen-activated protein kinase in control and endotoxin-primed rat lungs. *Lab. Invest.* 83: 333-47, 2003.
33. Ermert M., Dierkes C., Kuttner D., Eisenhardt N., Seeger W., und Ermert L.. Cox-2-dependent vascular and bronchial responses are regulated predominantly via ERK2 MAPK in endotoxin-primed rat lungs. submitted.
34. El Samalouti V.T., Schletter J., Chyla I., Lentschat A., Mamat U., Brade L., Flad H.D., Ulmer A.J., und Hamann L. Identification of the 80-kDa LPS-binding protein (LMP80) as decay-acceleration factor (DAF, CD55). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23: 259-69, 1999.
35. Fauci, Longo (eds.). Harrison`s Principales of Internal Medicine, 17th Edition. McGraw-Hill Book Company, 2008.
36. Favata M.F., Horiuchi K.Y., Manos E.J., Daulerio A.J., Stradley D.A., Feeser W.S., Van Dyk D.E., Pitts W.J., Earl R.A., Hobbs F., Copeland R.A., Magolda R.L., Scherle P.A., und. Trzaskos J.M.. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 18623–32, 1998.
37. Feng L., Sun W., Xia Y., Tang W.W, Chanmugam P., Soyoola E., Wilson C.B., und Hwang D.. Cloning tho isoforms of rat cyclooxygenase: Differential regulation of their expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 361-8, 1993.
38. Fijen J.W., Zijlstra J.G., De Boer P., Spanjersberg R., Tervaert J.W., Van der Werf T.S., Ligtenberg J.J., und Tulleken J.E.. Suppression of the clinical and cytokine response to endotoxin by RWJ-67657, a p38 mitogen-activated protein-kinase inhibitor, in healthy human volunteers. *Clin. Exp. Immunol.* 124: 16-20, 2001.

39. Frantz B., Klatt T., Pang M., Parsons J., Rolando A., Williams H., Tocci M.J., O'Keefe S.J., und O'Neill E.A.. The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. *Biochemistry* 37: 13846-53, 1998.
40. Goppelt-Struebe M.. Regulation of prostaglandin endoperoxidase synthetase (cyclooxygenase) isoenzyme expression. *Leukot. Essent. Fatty Acids* 52: 213-22, 1995.
41. De Gramont A., Tournigand C., André T., Larsen A., und Louvet C. Adjuvant therapy for stage II and III colorectal cancer. *Semin. Oncol.* 34 : 37-40, 2007.
42. Grimminger F., Walmrath D., Walter H., Lutz F., und Seeger W.. Induction of vascular injury by *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin in rabbit lungs is associated with the generation of different leukotrienes and hydroxyeicosatetraenoic acids. *J. Infect. Dis.* 163: 362-70, 1991.
43. Grishin A.V., Wang J., Potoka D.A., Hackham D.J., Upperman J.S., Boyle P., Zamora R., und Ford H.R.. Lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 in intestinal epithelium via a noncanonical p38 MAPK pathway. *J. Immunol.* 176: 580-8, 2006.
44. Guan Z., Buckman S.Y., Pentland A.P., Templeton D.J., und Morrison A.R.. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 3 SEK2/MKK4 3 p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 12901-08, 1998.
45. Guo R.F., Riedemann N.C., Sun L., Gao H., Shi K.X., Reuben J.S., Sarma V.J. Zetoune F.S., und Ward P.A.. Divergent signaling pathways in phagocytic cells during sepsis. *J. Immunol.* 177: 1306-13, 2006.

46. Hashimoto S., Gon Y., Matsumoto K., Maruoka S., Takeshita I., Hayashi S., Asai Y., Jibiki I., Machino T., und Horie T.. Selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-8 expression in human pulmonary vascular endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293: 370-5, 2000.
47. Haziot A., Ferrero E., Kontgen F., Hijiya N., Yamamoto S., Silver J., Stewart C.L., und Goyert S.M.. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4: 407-11, 1996.
48. Held H.D., und Uhlig S.. Mechanisms of endotoxin-induced airway and pulmonary vascular hyperreactivity in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162:1547-52, 2000.
49. Hempel S.L., Monick M.M., und Hunninghake G.W.. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J. Clin. Invest.* 93: 391-6, 1994.
50. Holtzmann M.J.. Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung injury and disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143: 188-203, 1991.
51. Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., und Akira S.. Cutting edge: Toll-Like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *lps* gene product1. *J. Immunol.* 162: 3749-52, 1999.
52. Hu M., Du Q., Vancurova I., Lin X., Miller E.J., Simms H.H. und Wang P.. Proapoptotic effect of curcumin on human neutrophils: activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Crit. Care Med.* 33: 2571-8, 2005.
53. Huang S., Armstrong E.A., Benavente S., Chinnaiyan P., und Harari P.M.. Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res.* 64: 5355-62, 2004.

54. Hwang D., Jang B.C., Yu G., and Boudreau M.. Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide. Mediation through both mitogen-activated protein-kinase and NF- κ B signaling pathways in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 54: 87-96, 1997.
55. Ingalls R.R., Arnaout M.A., Delude R.L., Flaherty S., Savedra R. Jr., and Golenbeck D.T.. The CD11/CD18 integrins: characterization of three novel LPS signaling receptors. *Prog. Clin. Biol. Res.* 397: 107-17, 1997.
56. Kawai T., Adachi O., Ogawa T, Takeda K., and Akira S.. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11: 115-22, 1999.
57. Kawai T., Takeuchi O., Fujita T., Inoue J., Muhlradt P.F., Sato S., Hoshino K., and Akira S.. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol.* 167: 5887-94, 2001.
58. Klein T., Nüsing R.M., Pfeilschifter J., und Ullrich V. Selective inhibition of cyclooxygenase 2. *Biochem. Pharmacol.* 48: 1605-10, 1994.
59. Koch T., Duncker H.P., Rosenkranz S., Neuhof H., und Van Ackern K.. Alterations of filtration coefficients in pulmonary edema of different pathogenesis. *J. Appl. Physiol.* 73: 2396-402, 1992.
60. Kogut M.H., Genovese K.J., und He H.. Flagellin and lipopolysaccharide stimulate the MEK-ERK signaling pathway in chicken heterophils through differential activation of the small GTPases, Ras and Rap1. *Mol. Immunol.* 44: 1729-36, 2007.
61. Kohno M., und Pouyssegur J.. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann. Med.* 38: 200-11. Review. 2006.

62. Kolch W.. Meaningful relationships : the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* 351: 289-305, 2000.
63. Kumar S., Jiang M.S., Adams J.L., and Lee J.C.. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 825-31, 1999.
64. Lasa M., Mahtani K.R., Finch A., Brewer G., Saklatvala J., and Clark A.. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol. Cell Biol.* 20: 4265-74, 2000.
65. Lee J.C., Kassis S., Kumar S., Badger A., and Adams J.L.. p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors-mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol. Ther.* 82: 389-97, 1999.
66. Lee S. H., Soyoola P., Chanmugam S., Hart W., Sun W., Zhong H., Liou S., Simmons D., and Hwang D.. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 267: 25934-38, 1992.
67. Leturcq D.J., Moriarty A.M., Talbott G., Winn R.K., Martin T.R., and Ulevitch R.J.. Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced shock. *J. Clin. Inv.* 98: 1533-38, 1996.
68. Li X., Luwor R., Lu Y., Liang K., and Fan Z.. Enhancement of antitumor activity of the anti-EGF receptor monoclonal antibody cetuximab/C225 by perifosine in PTEN-deficient cancer cells. *Oncogene.* 25: 525-35, 2006.
69. Llovet J.. Sorafenib improves survival in advanced hepatocellular carcinoma (HCC): Results of a phase III randomized placebo-controlled trial (SHARP trial). Presented at the American Society of Clinical Oncology (ASCO) annual meeting, 4th June, 2007.

70. Malik A.B., Perlman M.B., Cooper J.A., Noonan T., und Bizios R.. Pulmonary microvascular effects of arachidonic acid metabolites and their role in lung vascular injury. *Fed. Proc.* 44: 36-42, 1985.
71. Nagano S., Otsuka T., Niuro H., Yamaoka K., Arinobu Y., Ogami E., Akahoshi M., Onoue Y., Miyake K., Nakashima H., Niho Y., und Harada M.. Molecular mechanisms of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway and regulation by anti-inflammatory cytokines. *Int. Immunol.* 14: 733-40, 2002.
72. Navas T.A., Mohindru M., Estes M., Ma J.Y., Sokol L., Pahanish P., Parmar S., Haghazari E., Zhou L., Collins R., Kerr I., Nguyen A.N., Xu Y., Platanius L.C., List A.A., Higgins L.S., und Verma A.. Inhibition of overactivated p38 MAPK can restore hematopoiesis in myelodysplastic syndrome progenitors. *Blood* 108: 4170-7, 2006.
73. Newton R., Kuitert L.M.E., Bergmann M., Adcock I.M., und Barnes P.J.. Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 28-32, 1997.
74. N'Guessan P.D., Hippenstiel S., Etouem M.O., Zahlten J., Beermann W., Lindner D., Opitz B., Witzenrath M., Rosseau S., Suttorp N., und Schmeck B.. Streptococcus pneumoniae induced p38 MAPK- and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290: L1131-8, 2006.
75. Opal S.M.. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 365-77, 2007.
76. Pandey S., und Agrawal D.K.. Immunobiology of toll-like receptors: emerging trends. *Immunol. Cell. Biol.* 84: 333-41, 2006.

77. Pargellis C., und Regan J.. Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase for the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 4: 566-71. Review. 2003.
78. Pentland A.P., und Needleman P.. Modulation of keratinocyte proliferation in vitro by endogenous prostaglandin synthesis. *J. Clin. Invest.* 77: 246-51, 1986.
79. Pugin J.C., Schüler-Maly C.-C., Letturcq D., Moriarty A., Ulevitch R.J., und Tobias P.S. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2744-8, 1993.
80. Qureshi S., Lariviere M., Leveque G., Clermont S., Moore K.J., Gros P., und Malo D.. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* 189: 615-25, 1999.
81. Raetz C.R., Ulevitch R.J., Wright S.D., Sibley C.H. Ding A., und Nathan C.F.. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB* 5: 2652-60, 1991.
82. Rahman M.S., Yamasaki A., Yang J., Shan L., Halayko A.J., und Gounni A.S.. IL-17A induces eotaxin-1/CC chemokine ligand 11 expression in human airway smooth muscle cells: role of MAPK (Erk1/2, JNK, and p38) pathways. *J. Immunol.* 177: 4064-71, 2006.
83. Ramana K.V., Willis M.S., White M.D., Horton J.W., DiMaio J.m., Srivastava D., Bhatnagar A., und Srivastava S.K.. Endotoxin-induced cardiomyopathy and systemic inflammation in mice is prevented by aldose reductase inhibition. *Circulation* 114: 1838-46, 2006.

84. Rietschel E.T., Brade L., Brandenburg K., Flad H.D., de Jong-Leuvenick J., Kawahara K., Lindner B., Loppnow H., Luderitz T., und Schade U.. Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A. *Rev. Infect. Dis.* 9: 527-36, 1987.
85. Rietschel E.T., Schletter J., Weidemann B., El-Samalouti V., Mattern T., Zähringer U., Seydel U., Brade H., Flad H.D., Kusomoto S., Gupta D., Dzarski R., und Ulmer A.J. Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. *Microbial Drug Resistance Mechanisms Epidemiology and Disease* 4: 37-44, 1998.
86. Saif M.W.. Targeted agents for adjuvant therapy of colon cancer. *Clin. Colorectal Cancer.* 6: 46-51, 2006.
87. Schreiber S., Feagan B., D'Haens G., Colombel J.F., Geboes K., Yurcov M., Isakov V., Golovenko O., Bernstein C.N., Ludwig D., Winter T., Meier U., Yong C., und Steffgen J.. Oral p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with BIRB 796 for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4: 325-34, 2006.
88. Schütte H., Rosseau S., Czymek R., Ermert L., Walmrath D., Krämer H.J., Seeger W., und Grimminger F.. Synergism between endotoxin priming and exotoxin challenge in provoking severe vascular leakage in rabbit lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 819-24, 1997.
89. Schumann R.R., Pfeil D., Lamping N., Kirschning C., Schlag P., Karawajew L., und Herrmann F.. Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein-kinases ERK-1 and p38 in cultured human vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14. *Blood* 87: 2805-14, 1996.
90. Schwandner R., Dziarski R., Wesche H., Rothe M., und Kirschning C.J.. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274: 17406–9, 1999.

91. See F., Thomas W., Way K., Tzanidis A., Kompa A., Lewis D., Itescu S., and Krum H.. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44: 1679-89, 2004.
92. Seeger W., Wolf H., Stahler G., Neuhof H., and Roka L.. Increased pulmonary vascular resistance and permeability due to arachidonate metabolism in isolated rabbit lungs. *Prostaglandins* 23: 157-73, 1982.
93. Seeger W., Bauer M., and Bhakdi S.. Staphylococcal alpha-toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. Evidence for thromboxane formation and the role of extracellular calcium. *J. Clin. Invest.* 74: 849-58, 1984.
94. Seeger W., Walmrath D. Menger M., and Neuhof H.. Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. *J. Appl. Physiol.* 61: 1781-9, 1986.
95. Seibert K., Sheller J.R., and Roberts L.J.. (5Z,13E)-(15S)-9 α ,11 β ,15-trihydroxyprosta-5,13-dien-1-oic acid (9 α ,11 β -prostaglandin F₂): formation and metabolism by human lung and contractile effects on human bronchial smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 256-60, 1987.
96. Selig W.M., Noonan T.C., Kern D.F., and Malik A.B.. Pulmonary microvascular responses to arachidonic acid in isolated guinea pig lung. *J. Appl. Physiol.* 60: 1972-9, 1986.
97. Sengupta T.K., Leclerc G.M., Hsieh Kinser T.T., Leclerc G.J., Singh I., and Barredo J.C.. Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. *Mol. Cancer* 6: 46, 2007.
98. Shibamoto T., Wang H.G., Yamaguchi Y., Hayashi T., Saeki Y., Tanaka S., and Koyama S.. Effects of thromboxane A₂ analogue on vascular resistance distribution and permeability in isolated blood-perfused dog lungs. *Lung* 173: 209-21, 1995.

99. Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., and Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189: 1777–82, 1999.
100. Sibelius U., Grandel U., Buerke M., Mueller D., Kiss L., Kraemer H.J., Braun-Dullaeus R., Haberbosch W., Seeger W., and Grimminger F.. Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* 101: 78-85, 2000.
101. Sridhar S.S., Hedley D., and Siu L.L.. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol. Cancer Ther.* 4: 677-85, 2005.
102. Streudel W., Krämer H.J., Degner D., Rosseau S., Schütte H., Walmrath D., and Seeger W.. Endotoxin priming of thromboxane-related vasoconstrictor responses in perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 83: 18-24, 1997.
103. Suzuki N., Suzuki S., Duncan G.S., Millar D.G., Wada T., Mirtsos C., Takada H., Wakeham A., Itie A., Li S., Penninger J.M., Wesche H., Ohashi P.S., Mak T.W., and Yeh W.C.. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416: 750-6, 2002.
104. Tegeder I., Neupert W., Guhring H., and Geisslinger G.. Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 1161-8, 2000.
105. Toledo-Pereyra L.H.. Critical role of p38 mitogen protein kinase in sepsis. *Crit. Care Med.* 36: 482-8, 2008.
106. Townsley M.I., Korthuis R.J., and Taylor A.E.. Effects of arachidonate on permeability and resistance distribution in canine lungs. *J. Appl. Physiol.* 58: 206-10, 1985a.

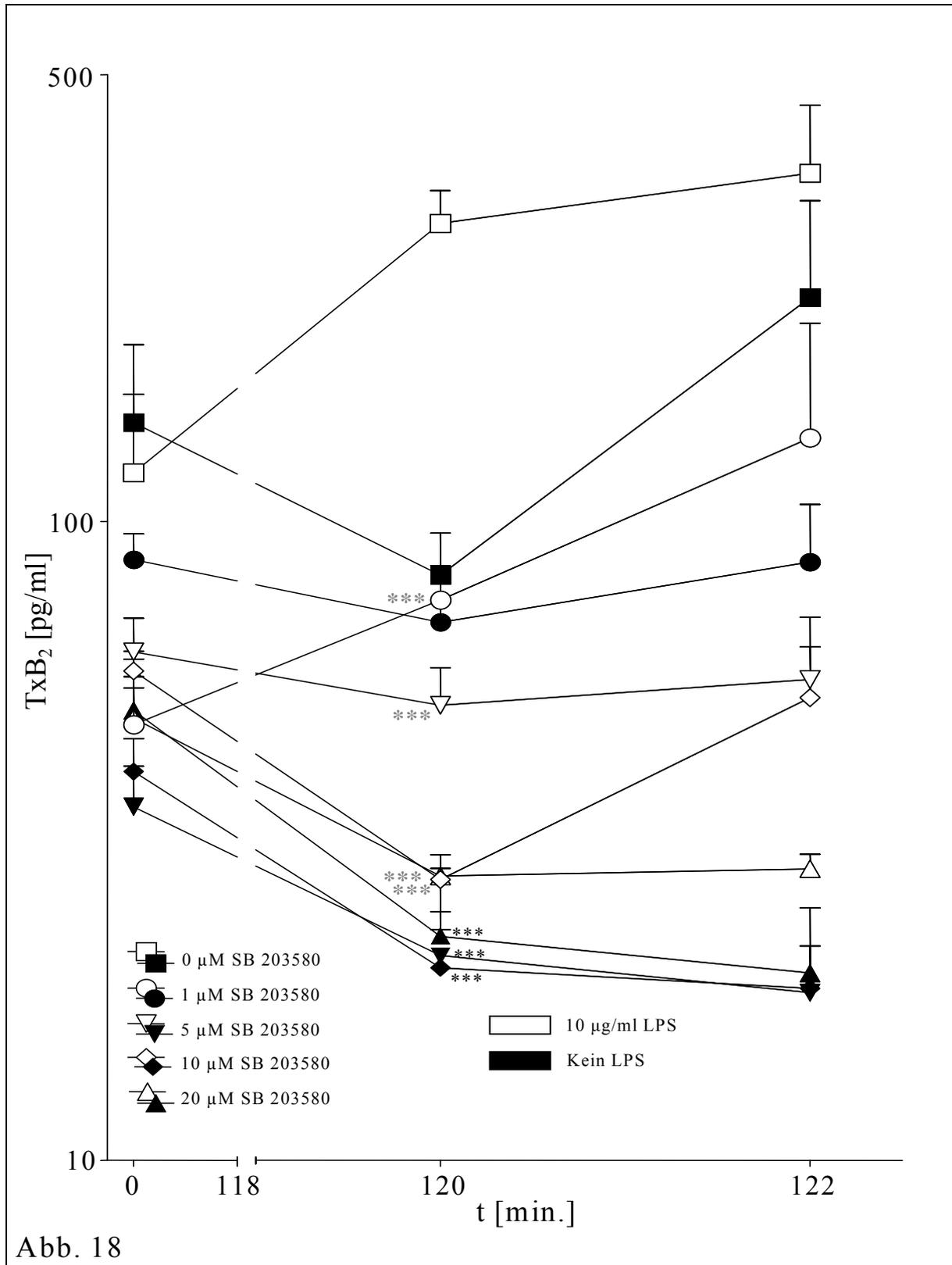
107. Townsley M.I., Korthuis R.J., und Taylor A.E.. Specific hemodynamic effects of PGE2 and PGF1 alpha in the canine lung. *Prostaglandins Leukot. Med.* 20: 275-82, 1985b.
108. Triantafilou M., und Triantafilou K.. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends. Immunol.* 23: 301-4, 2002.
109. Triantafilou M., Brandenburg K., Kusumoto S., Fukase K., Mackie A., Seydel U., und Triantafilou K.. Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *Biochem. J.* 381: 527–36, 2004.
110. Ulevitch R.J.. Regulation of receptor-dependent activation of the innate immune response. *J. Infect. Dis.* 187: 351–5, 2003.
111. Ulivi V., Giannoni P., Gentili C., Cancedda R., und Descalzi F.. p38/NF-kB-dependent expression of COX-2 during differentiation and inflammatory response of chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 104:1393-406, 2008.
112. Visintin, A., Latz E., Monks, B.G., Espevik T., und Golenbock D.T.. Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 278: 48313–20, 2003.
113. Walmrath D., Scharmann M., Konig R., Pilch J., Grimminger F., und Seeger W.. Staphylococcal alpha-toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 74: 1972-80, 1993
114. Walmrath D, Ghofrani H.A., Rosseau S., Schütte H., Cramer A., Kaddus W., Grimminger F., Bhakdi S., und Seeger W.. Endotoxin "priming" potentiates lung vascular abnormalities in response to Escherichia coli hemolysin: an example of synergism between endo- and exotoxin. *J. Exp. Med.* 180: 1437-43, 1994.
115. Wang Y.. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation* 116: 1413-23, 2007.

116. Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., and Mathison J.C.. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-3, 1990.
117. Wright S.D.. Multiple receptors for endotoxin. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 83-90, 1991.
118. Wu G., Luo J., Rana J.S., Laham R., Sellke F.W., and Li J.. Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via p38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 69: 512-9, 2006.
119. Yang H., Young D.W., Gusovsky F., and Chow J.C.. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 275: 20861–66, 2000.
120. Yano M., Matsumura T., Senokuchi T., Ishii N., Murata Y., Taketa K., Motoshima H., Taguchi T., Sonoda K., Kukidome D., Takuwa Y., Kawada T., Brownlee M., Nishikawa T., and Araki E.. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ. Res.* 100: 1442-51, 2007.
121. Yasui H., Hideshima T., Ikeda H., Jin J., Ocio E.M., Kiziltepe T., Okawa Y., Vallet S., Podar K., Ishitsuka K., Richardson P.G., Pargellis C., Moss N., Raje N., and Anderson K.C.. BIRB 796 enhances cytotoxicity triggered by bortezomib, heat shock protein (Hsp) 90 inhibitor, and dexamethasone via inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp27 pathway in multiple myeloma cell lines and inhibits paracrine tumour growth. *Br. J. Haematol.* 136: 414-23, 2007.
122. Yethon J.A., and Whitfield C.. Lipopolysaccharide as a target for the development of novel therapeutics in gram-negative bacteria. *Curr. Drug. Targets Infect. Disord.*, 1: 91-106, 2001.

123. Yoshimura K., Tod M.L., Pier K.G., and Rubin L.J.. Role of venoconstriction in thromboxane-induced pulmonary hypertension and edema in lambs. *J. Appl. Physiol.* 66: 929-35, 1989.
124. Yu P., Hatakeyama T., Aramoto H., Miyata T., Shigematsu H., Nagawa H., Hobson R.W., and Duran W.N.. Mitogen-activated protein kinases regulate platelet-activating factor-induced hyperpermeability. *Microcirculation* 12: 637-43, 2005.
125. Zhang G., and Ghosh S. Molecular mechanisms of NF- κ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through toll-like receptors. *J. Endotox. Res.* 6: 453-7, 2000.
126. Zhang J., Shen B., and Lin A.. Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. *Trends Pharmacol. Sci.* 28: 286-95, 2007.
127. Zhang Y., and Dong C.. MAP kinases in immune responses. *Cell. Mol. Immunology* 2: 20-7, 2005.

7 Anhang

7.1 Diagramme



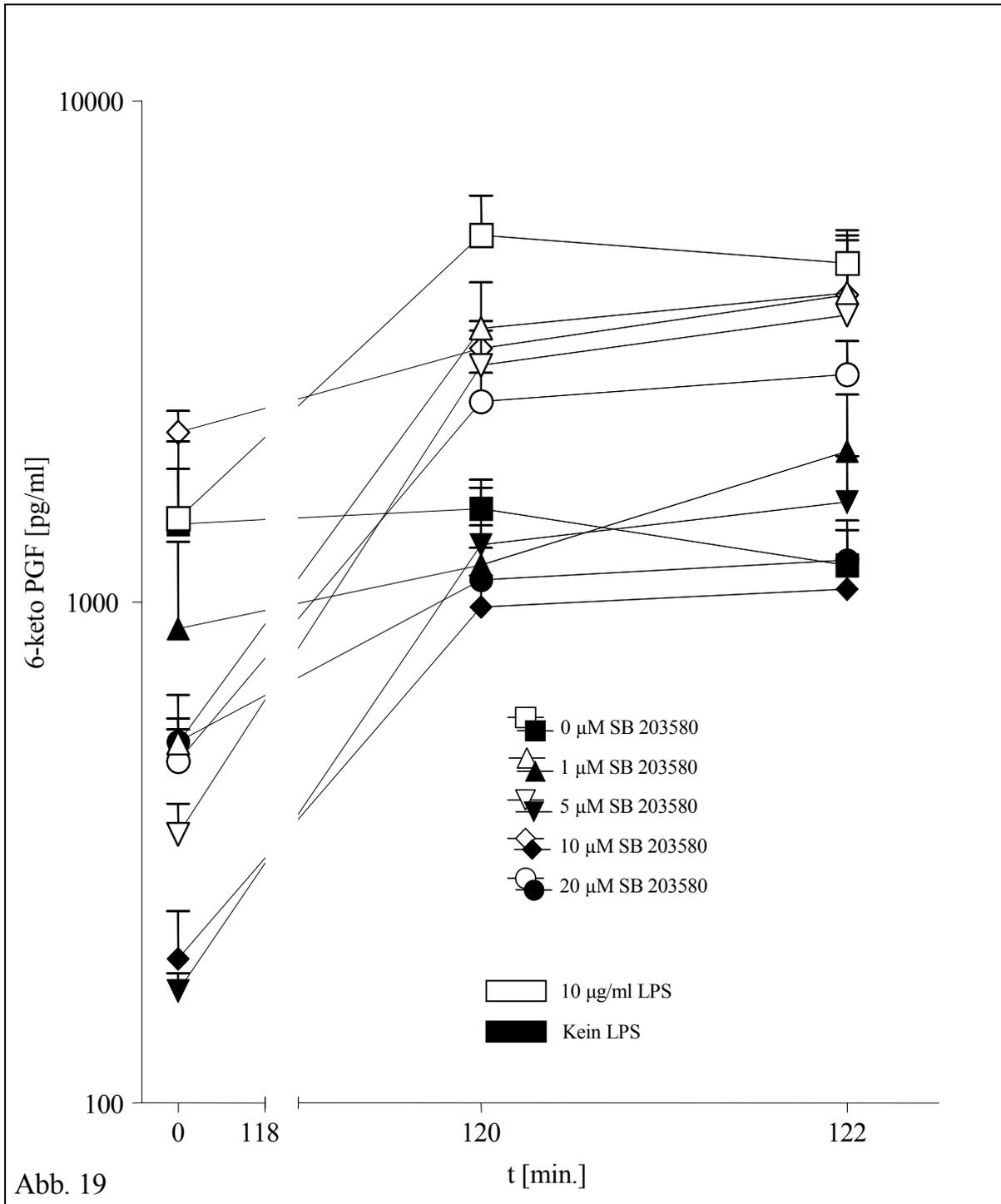
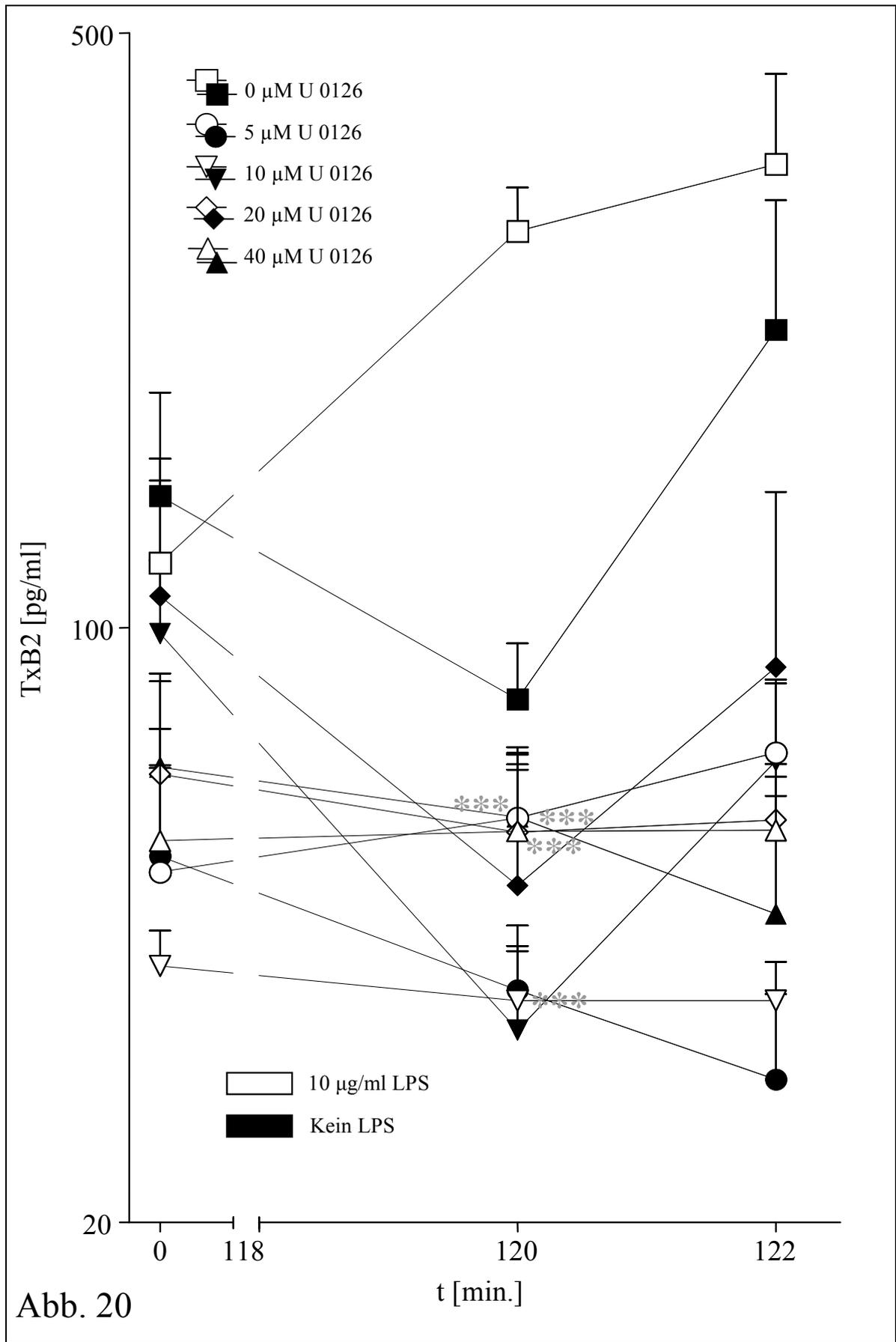


Abb. 18 und 19: Zeitlicher Verlauf der Liberation von TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ im rezirkulierenden Perfusat vor AA-Applikation in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen mit Inhibitorzusatz (SB203580). Insbesondere fällt der dosisabhängige, supprimierende Einfluss der p38-Inhibition auf die TxB_2 -Synthese während der ersten zwei Stunden sowohl in LPS-stimulierten als auch unstimulierten Versuchsgruppen auf. *** ($p < 0,001$) = signifikante Differenz der MW der Konzentrationen von TxB_2 der Inhibitorgruppen zum Zeitpunkt $t=120'$ im Vergleich zu den LPS-stimulierten und unstimulierten Kontrollexperimenten ($0 \mu\text{M}$). Die Werte für TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ zum Zeitpunkt $t=125'$ wurden der Übersicht halber oben dargestellt.



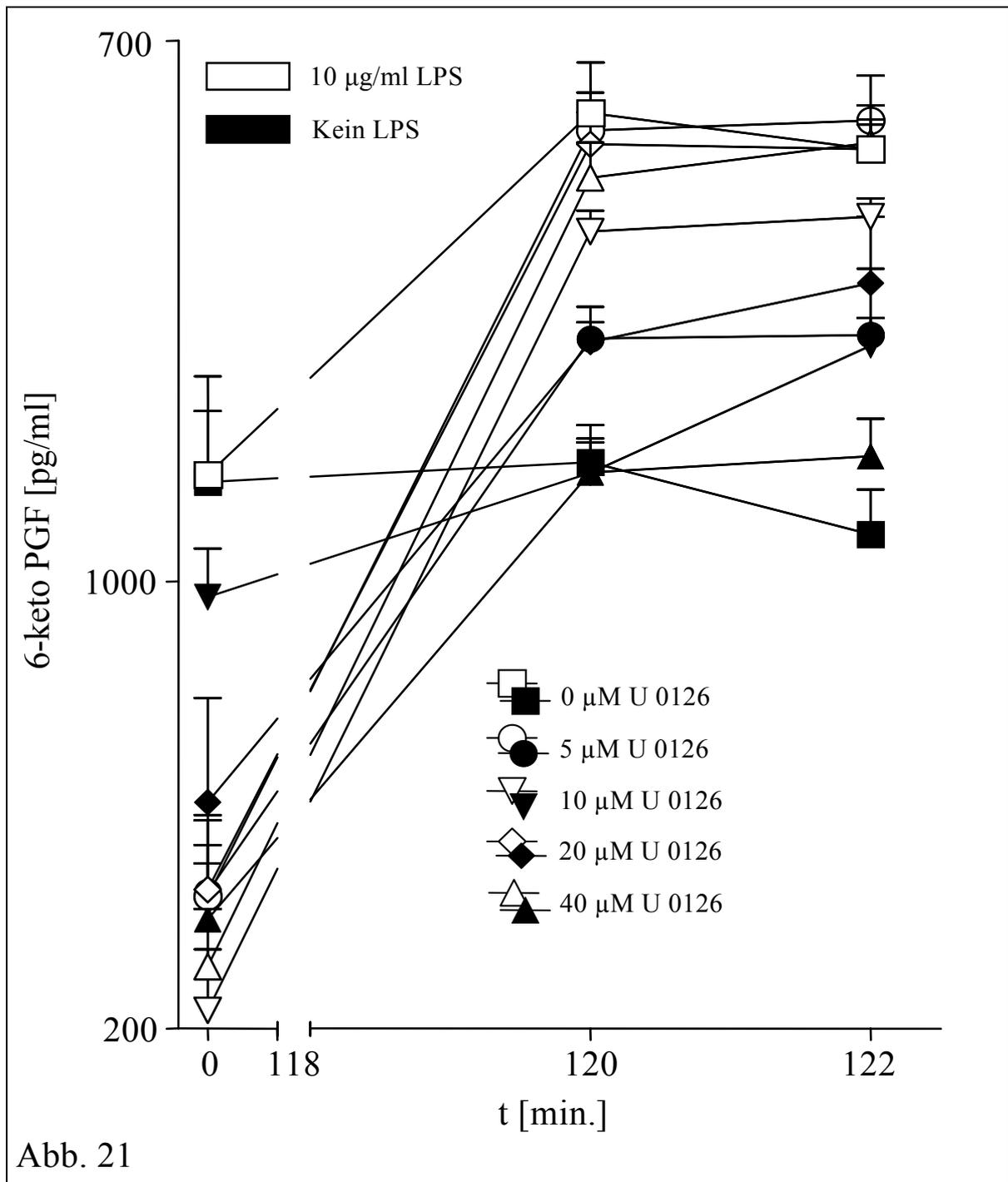


Abb. 20 und 21: Zeitlicher Verlauf der Liberation von TxB_2 (Abb. 20) und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (Abb.21) im rezirkulierenden Perfusat vor AA-Applikation in LPS-stimulierten und unstimulierten Rattenlungen mit Inhibitorzusatz (U 0126). Insbesondere fällt der dosisabhängige, supprimierende Einfluss der MEK1/2-Inhibition auf die TxB_2 -Synthese während der ersten zwei Stunden in LPS-stimulierten Organen auf. Die MEK1/2-Inhibition hat keine Auswirkungen auf die Liberation von TxB_2 in LPS-unstimulierten Rattenlungen. *** ($p < 0,001$) = signifikante Differenz der MW der Konzentrationen von TxB_2 der LPS-stimulierten Inhibitorgruppen zum Zeitpunkt $t=120'$ im Vergleich zu den LPS-stimulierten Kontrollexperimenten ($0\mu\text{M}$). Die Werte für TxB_2 und 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ zum Zeitpunkt $t=125'$ wurden der Übersicht halber gesondert oben dargestellt.

7.2 Experimentelle Agenzien und Pharmaka

- 6-keto-Prostaglandin F_{1α} Immunoassay, R&D Systems (Minneapolis, USA)
- Aqua ad injectabile, Baxter (Unterschleißheim, Deutschland)
- Arachidonsäure (Eicosa-5Z, 8Z, 11Z, 14Z-tetraenoic acid), Paesel und Lorei (Hanau, Deutschland)
- Braunoderm® , Povidon-Jodlösung, B. Braun Medical (Melsungen, Deutschland)
- DMSO (Dimethylsulfoxid), Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (C₂H₅OH) absoult für Analyse, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
- Isotone Kochsalzlösung 0,9% (NaCl 0,9%), Baxter (Unterschleißheim, Deutschland)
- Lipopolysaccharid von Salmonella abortus equi, Cytogen (Deutschland)
- Liquemin® 25000 I.E. Natriumheparin/5ml, Hoffman La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- NaHCO₃ 8,4%, Baxter (Unterschleißheim, Deutschland)
- Narcoren® (Pentobarbital-Natrium), Merial GmbH (Halbergmoos, Deutschland)
- Perfusatlösung I/3, Serag-Wiessner KG (Naila, Deutschland)
- Prostaglandin E₂ Immunoassay, R&D Systems (Minneapolis, USA)
- Prostaglandin F_{2α} Immunoassay, R&D Systems (Minneapolis, USA)
- SB 203580 [4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole], Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)
- SC68376 [2-Methyl-4-phenyl-5-(4-pyridyl)oxazole], Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)
- Thromboxan B₂ Immunoassay, Cayman Chemical Company (Ann Arbor, USA)
- U0126 [1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene], Promega Corporation (Madison, USA)
- Xylocain® 2% (Lidocainhydrochlorid), ASTRA Chemicals (Wedel, Deutschland)

7.3 Hilfsmittel und Geräte

- Beatmungsgerät “Small Animal Ventilator KTR-4”, Hugo Sachs Elektronik (March, Deutschland)
- Blutgasanalysegerät ABL 330, Radiometer (Copenhagen, Dänemark)
- CO₂-Flüssiggas, Messer GmbH (Griesheim/Ffm, Deutschland)
- Druckaufnehmer Combitrans® Monitoring-Set, B. Braun Medical (Melsungen, Deutschland)
- Hamilton Präzisionspritze 50/100 µl, Hamilton (Darmstadt, Deutschland)
- Masterflex-Schlauchpumpe mit Easy-Load Pumpenkopf Model 7518-10, Cole-Parmer Instruments Co. (Chicago, USA)
- Messverstärker, Hellige (Freiburg, Deutschland)
- Perfusionsschläuche:
 - Masterflex-Pumpenschlauch Tygon, Cole-Parmer Instruments Co. (Chicago, USA)
 - Silikon-Schlauch, Fischer (Deutschland)
- Punktionskanülen 0,45/0,55/1,2 mm, Terumo Co. (Leuven, Belgien)
- Thermopumpe (Frigomix 1495/Thermomix 1442D), Braun (Melsungen, Deutschland)
- Vakuumentrifuge, Haereus (Hanau, Deutschland)
- Wägezelle Kraftaufnehmer Typ U, Hottinger Baldwin Messtechnik (Darmstadt, Deutschland)
- Zentrifuge RPC Rotana, Hettich (Tutingen, Deutschland)
- ELISA-Reader Hölzel Diagnostika GmbH (Köln, Deutschland)

8 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

M. Ermert, D. Kuttner, N. Eisenhardt, C. Dierkes, W. Seeger, und L. Ermert. Cox-2 and thromboxane-dependent vascular and bronchial responses are regulated via p38 MAPK in control and endotoxin-primed rat lungs. *Lab. Invest.* 83: 333-47, 2003.

M. Ermert, C. Dierkes, D. Kuttner, N. Eisenhardt, W. Seeger, und L. Ermert. Cox-2-dependent vascular and bronchial responses are regulated predominantly via ERK2 MAPK in endotoxin-primed rat lungs. submitted.

Abstracts und veröffentliche Vorträge

Ermert M., Kuttner D., Seeger W., und Ermert L.. Selective inhibition and immunohistochemical detection of the p38 MAP-kinase in response to bacterial endotoxin in isolated rat lungs. *Pathol. Res. Pract.* 197: 296, 2001. 85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 6.-9. Juni 2001 in Münster

ATS-Meeting in San Francisco:

Ermert L., Kuttner D., Eisenhardt N., Seeger W., und Ermert M.. Selective inhibition of the MAP-kinase p38 and ERK 1/2 in control and endotoxin-challenged isolated rat lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163: A275, 2001

Dierkes C., Ermert M., Kuttner D., Seeger W., und Ermert L.. Zelluläre Expression und Regulation von ERK 1/2 MAP-Kinase Aktivität nach Gabe von LPS und Plasmafaktoren in isoliert perfundierten Rattenlungen. *Pathol. Res. Pract.* 198:159, 2002. 86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 3.-6. April 2002 in Wien

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Leander Ermert und meiner Betreuerin Frau Dr. Monika Ermert für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die investierte Geduld und das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Seeger möchte ich für die Möglichkeit der experimentellen Umsetzung der Doktorarbeit im Lungenlabor des SFB 547 danken. Gleiches gilt für die Mitarbeiter des Lungenlabors, deren Mithilfe ich sehr schätzte.

Meinen Eltern danke ich für ihre stetige Unterstützung, die zur Entstehung dieser Arbeit maßgeblich beigetragen hat.