

**UNTERSUCHUNGEN ZUM
“GRAMPOSITIVEN UND GRAMNEGATIVEN PRIMING“
DER ISOLIERTEN RATTENLUNGE UNTER
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER
INTRAZELLULÄREN ENZYMATISCHEN
SIGNALTRANSDUKTION**

SUSANNE RÖRTGEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

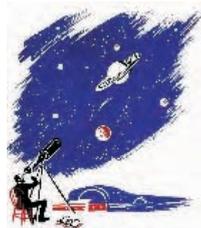
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

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

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

Aus
dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. R. Gerstberger
und
dem Institut für Pathologie, Sonderforschungsbereich 547
im Fachbereich Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: PD Dr. L. Ermert

**Untersuchungen zum
“grampositiven und gramnegativen Priming“
der isolierten Rattenlunge
unter besonderer Berücksichtigung
der intrazellulären enzymatischen Signaltransduktion**

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

eingereicht von

Susanne Rörtgen

Tierärztin aus Krefeld

Gießen 2008

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

PD Dr. Leander Ermert

Tag der Disputation: 30.05.2008

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Sepsis und Acute respiratory distress syndrome (ARDS)	1
1.2 Die isolierte Rattenlunge als ARDS-Modell	3
1.3 "Priming" der isolierten und blutfrei perfundierten Lunge durch gram- negative Bakterienwandbestandteile	4
1.3.1 Lipopolysaccharid	5
1.3.2 Lipopolysaccharid-Rezeptoren	7
1.3.3 Lipopolysaccharid-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion	11
1.3.4 Zellspezifische Effektorsysteme des "gramnegativen Primings" ...	16
1.3.5 Physiologisch messbare Reaktionen in der isolierten und blutfrei perfundierten Rattenlunge bei "gramnegativem Priming"	21
1.4 "Priming" der isolierten und blutfrei perfundierten Lunge durch gram- positive Bakterienwandbestandteile	22
1.4.1 Lipoteichonsäure und Peptidoglycan	22
1.4.2 Lipoteichonsäure- und Peptidoglycan-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion und ihre Effektorsysteme	25
1.4.3 Physiologisch messbare Reaktionen in der isolierten und blutfrei perfundierten Rattenlunge bei "grampositivem Priming"	27
2. ZIELE DER ARBEIT	28
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 Materialliste	30
3.1.1 Chemikalien	30
3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	31
3.2 Angaben zu den verwendeten Inhibitoren	32
3.2.1 Proteinkinase A (PKA)-Inhibitor	32
3.2.2 Proteinkinase C (PKC)-Inhibitor	33
3.2.3 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Inhibitoren	34

3.2.4	Zyklooxygenase (Cox)-2-Inhibitoren	35
3.3	Versuchstiere	35
3.4	Tierpräparation mit Lungenisolation, Ventilation und Perfusion	35
3.5	Extrakorporales Zirkulationssystem	37
3.6	Kontrolle von pH-Wert und Beatmungsluft	38
3.7	Perfusionsdruck-, Beatmungsdruck- und Gewichtsmonitoring	38
3.8	Versuchsprotokoll	40
3.8.1	Kontrollversuche	41
3.8.2	“Priming“-Versuche	41
3.8.2.1	Untersuchungen zum “gramnegativen Priming“	41
3.8.2.2	Untersuchungen zum “gramnegativen Priming“ mit Einsatz von verschiedenen Proteinkinase (PK)-Inhibitoren	42
3.8.2.3	Untersuchungen zum “grampositiven Priming“	43
3.8.2.4	Untersuchungen zum “grampositiven Priming“ mit Einsatz von verschiedenen Inhibitoren der intrazellulären Signal- transduktion sowie Zyklooxygenase (Cox)-2-Inhibitoren	44
3.9	Perfusatprobenanalyse durch Bestimmung von Thromboxan B ₂ , 6-keto-Prostaglandin F _{1α} und Prostaglandin E ₂	46
3.10	Statistische Analyse	47
4.	ERGEBNISSE	49
4.1	Kontrollversuche	49
4.2	“Priming“-Versuche	49
4.2.1	Untersuchungen zum “gramnegativen Priming“	49
4.2.2	Untersuchungen zum “gramnegativen Priming“ mit Einsatz von verschiedenen Proteinkinase (PK)-Inhibitoren	54
4.2.3	Untersuchungen zum “grampositiven Priming“	62
4.2.4	Untersuchungen zum “grampositiven Priming“ mit Einsatz von verschiedenen Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion sowie Zyklooxygenase (Cox)-2-Inhibitoren	66
5.	DISKUSSION	80
5.1	Kontrollversuche	80
5.2	“Priming“-Versuche	81

5.2.1	Untersuchungen zum "gramnegativen Priming"	81
5.2.2	Untersuchungen zum "gramnegativen Priming" mit Einsatz von verschiedenen Proteinkinase (PK)-Inhibitoren	81
5.2.3	Untersuchungen zum "grampositiven Priming"	90
5.2.4	Untersuchungen zum "grampositiven Priming" mit Einsatz von verschiedenen Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion sowie Zyklusoxigenase (Cox)-2-Inhibitoren	91
6.	ZUSAMMENFASSUNG	98
7.	SUMMARY	101
8.	LITERATURVERZEICHNIS	104
9.	ANHANG	133
9.1	Tabellen	133
10.	DANKSAGUNG	140
11.	ERKLÄRUNG	141

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AA	Arachidonsäure (arachidonic acid)
ARDS	Schweres akutes Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome)
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CHO	Chinese hamster ovary
Cox	Zyklooxygenase
Cox-1v	Zyklooxygenase-1-Variante
CRE	Cyclic adenosinmonophosphate responsive element
DAF	Decay accelerating factor
DAG	Diacylglycerin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EP	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IC ₅₀	Halbmaximale Inhibition der Enzymaktivität
I.E.	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-(1,4,5)-triphosphat
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxydsynthase
JNK	c-Jun aminoternale Proteinkinase
Kdo	2-Keto-3-desoxy-octonsäure
Ki	Halbmaximale Ligandenbindung
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LLR	Leucine rich repeat
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure (lipoteichoic acid)
LVP	Linksventrikulärer Druck
M	Mol/Liter
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKAPK2	Mitogen aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase-2

mCD14	Membranständiges (membrane) CD14
MDP	Muramyldipeptid (N-Acetylmuramyl-L-Alanin-D-Isoglutamin)
MEK	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase
meso-DAP	meso-Diaminopimelinsäure
NF-IL6	Nukleärer Faktor Interleukin-6
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NO	Stickstoffmonoxyd
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (nucleotide-binding oligomerisation domain)
NOS	Stickstoffmonoxydsynthase
NSAID	Nichtsteroidales Antiphlogistikum
PAP	Pulmonaler arterieller Druck
pCox	Partielle Zyklus-oxygenase
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PepG	Peptidoglycan
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGE-Synthase	Prostaglandinsynthase
6-keto-PGF _{1α}	6-keto-Prostaglandin F _{1α}
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostazyklin
PGI-Synthase	Prostazyklinsynthase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
PK	Proteinkinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PS	Phosphatidylserin
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
sCD14	Lösliches (soluble) CD14
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor

TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂
TX-Synthase	Thromboxansynthase
VP	Ventilationsdruck
W	Gewicht

Verwendete griechische Zeichen

α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
ϵ	epsilon
ζ	zeta
η	eta
θ	theta
ι	jota
κ	kappa
λ	lambda
μ	mü

1. EINLEITUNG

1.1 Sepsis und Acute respiratory distress syndrome (ARDS)

Die bakterielle Sepsis mit systemischer Entzündung, Makrophagenaktivierung sowie Monokin- und Lymphokinproduktion kann zu septischem Schock führen, charakterisiert durch eine ausgeprägte systemische Hypotension und häufig verbunden mit Multiorganversagen, disseminierter vasaler Gerinnung und Todesfolge (Weidemann et al., 1997). Der üblicherweise als Konsequenz gramnegativer Infektionen (Endotoxinschock) angesehene septische Schock kann auch durch grampositive Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten ausgelöst werden (Bone, 1994). Die Häufigkeit des septischen Schocks hat in den letzten 15-20 Jahren deutlich zugenommen und heute sind grampositive Bakterien die Ursache für 30-50 % aller Sepsisfälle (Bone, 1994; Brun-Buisson, 1996). Auf den Intensivstationen stellt der septische Schock die häufigste Todesursache dar (Parillo, 1993).

Bei nahezu 43 % der Sepsispatienten wird durch eine Sepsis die Entwicklung des im deutschsprachigen Raum auch als schweres akutes Lungenversagen bezeichneten ARDS ausgelöst (Hudson et al., 1995), mit einer überschießenden, inflammatorischen Reaktion im Bereich des Lungenparenchyms, die zu lebensbedrohlichen Störungen der pulmonalen Vasomotion, der alveolären Ventilation und des Gasaustausches führt (Günther et al., 2001). Eine erste deskriptive Studie über ARDS-Patienten erfolgte durch Ashbough und Mitarbeiter (Ashbough et al., 1967). ARDS wird immer noch als wichtiges Problem der Intensivmedizin mit hoher Mortalitätsrate beschrieben. Von allen Patienten, die auf der Intensivstation beatmet werden, sind 16-18 % von ARDS betroffen (Luhr et al., 1999). Ansonsten wird ARDS mit einer Häufigkeit von 13,5 (Luhr et al., 1999) bis 75 (Ware und Matthay, 2000) Fällen pro 100 000 Personen pro Jahr beschrieben. Mehrere Studien, welche die Mortalität durch ARDS untersucht haben, identifizierten das Sepsissyndrom und systemisches Multiorganversagen als die hauptsächlichen Todesursachen. Obwohl viele therapeutische Interventionsstrategien entwickelt und klinische Zufallsproben beurteilt wurden, hat keine Behandlungsmethode eine deutliche Abnahme der Mortalitätsrate dieses Syndroms gezeigt. In einer aktuellen Arbeit wurde die im Zeitraum von 1994 bis 2006 in repräsentativen Studien

angegebene Mortalitätsrate von Patienten mit ARDS verglichen (Zambon und Vincent, 2008). Die Mortalitätsrate variierte in den Studien zwischen 15 und 72 % mit einem ermittelten Durchschnittswert von 43 %. Eine Metaregressionsanalyse ließ eine Abnahme der Mortalitätsrate um 1,1 % pro Jahr in dem untersuchten Zeitraum vermuten. Auch einige Studien nehmen an, dass die Mortalitätsrate sinkt (Milberg et al., 1995; Morris et al., 1994; Rocco et al., 2001). In einer Studie der Universität Washington (Milberg et al., 1995) wird die verringerte Mortalität bei dem durch ein Trauma ausgelösten ARDS für diese geringere Mortalitätsrate verantwortlich gemacht. Im Gegensatz dazu gab es zwischen 1983 und 1993 keine Veränderung der Mortalitätsrate bei dem durch eine Sepsis ausgelösten ARDS. Die Mortalitätsrate von bis zu 60 % bei Sepsis-induziertem ARDS liegt höher als bei durch andere Ursachen ausgelöstem ARDS (Russel und Walley, 1999). Weitere Hauptrisikofaktoren, die neben Sepsis zum ARDS führen können, sind die Aspiration oder Inhalation von schädlichen Substanzen wie Mageninhalt oder toxischen Gasen, multiple Traumen und multiple Transfusionen sowie Lungenkontusion oder Pneumonie.

Die pathologischen Veränderungen der Lunge im Rahmen des ARDS lassen sich in drei Phasen aufteilen: die akute, exsudative Phase (bis zu 6 Tage), die proliferative Phase (4-10 Tage) und die finale, fibrotische Phase (8 Tage und länger) (Russel und Walley, 1999). Die erste Phase ist gekennzeichnet durch eine Zunahme der kapillarendothelialen und/oder alveolarepithelialen Permeabilität und der Ausbildung eines interstitiellen und später auch alveolären Ödems. Es kommt zu einer Vasokonstriktion und Mikroembolisierung oder Mikrothrombosierung im vaskulären Kompartiment und folglich zu einer erhöhten Resistenz der pulmonalen Gefäße mit Fehlverteilung der pulmonalen Perfusion. Zusätzlich favorisiert eine Zunahme der alveolären Oberflächenspannung, ausgelöst durch schwerwiegende Veränderungen im pulmonalen Surfactant-System, die alveoläre Instabilität mit Atelektasebildung und Inhomogenität der Ventilation. Als Konsequenz entwickeln sich profunde Störungen im Verhältnis der alveolären Ventilation zur Lungenperfusion mit einem ausgeprägten intrapulmonalen Shuntfluss und stark vermindertem Gasaustausch (Günther et al., 2001). Der erhöhte intrapulmonale Rechts-Links-Shunt des Blutes, assoziiert mit einem alveolären Ödem und dem Verlust der hypoxämischen pulmonalen Vasokonstriktion, stellt vor der Verteilungsstörung zwischen Ventilation und Perfusion

die Hauptursache für die mit dem ARDS verbundene Hypoxämie dar (Russel und Walley, 1999).

1.2 Die isolierte Rattenlunge als ARDS-Modell

Die klinischen Charakteristika des ARDS ähneln denen einer bei Versuchstieren experimentell erzeugten Endotoxämie. Die intravenöse Verabreichung von Endotoxinen bei anästhesierten und auch nicht anästhesierten (Esbenshade et al., 1982) Tieren ist daher zu einer anerkannten Methode zur Erforschung der pathophysiologischen und biochemischen Vorgänge im Zusammenhang mit ARDS geworden. Bei den Ganztiermodellen und isolierten Tierlungenmodellen wird hauptsächlich mit Schafen (Esbenshade et al., 1982; Hanaoka et al., 2002; Smith et al., 1981), Schweinen (Hoffmann et al., 1990; Modig und Borg, 1985; Ullrich et al., 2001) und Ratten (Davidson et al., 2002; Simons et al., 1991) gearbeitet, aber auch mit Kühen (Meyrick et al., 1989), Kaninchen (Hasan et al., 1984; Hayashi et al., 2000), Meerschweinchen (Serfilippi et al., 1994) und Hunden (Weir et al., 1976).

Isoliert perfundierte Lungen werden seit langem genutzt, um die physiologischen, metabolischen und biochemischen Aspekte dieses Organs zu erforschen (Fisher et al., 1979; Moxley und Longmore, 1977). Auch für das Studium der pathogenetischen Vorgänge während der exsudativen Phase des ARDS wird diese Technik angewendet (Glauser et al., 1978; Wolf und Seeger, 1982). Das Modell der isolierten, blutfrei perfundierten und ventilerten Lunge des Kaninchens ist ein seit mehreren Jahren in der Arbeitsgruppe Seeger und Mitarbeiter etabliertes und bewährtes Organmodell (Seeger et al., 1984, 1985, 1987, 1994) ebenso wie das seit 1995 von L. Ermert in dieser Arbeitsgruppe eingerichtete Modell der isolierten Rattenlunge (Ermert et al., 1998a, 2000a, 2000c, 2002). Das Modell der isoliert perfundierten Lunge ist mit der Einschränkung, dass es nicht exakt die gleichen physiologischen Bedingungen wie *in vivo* repräsentieren kann, ein wichtiges und notwendiges Modell zur Untersuchung der verschiedenen Lungenzelltypen im intakten Organverbund ohne die Wechselwirkungen, die im Tierversuch mit den anderen Organen zwangsläufig auftreten. Die Anwendung des isolierten Perfusionsmodells hat eine Reihe von Vorteilen, aber auch Grenzen.

Zu den Vorteilen zählt die Möglichkeit Studien an einem intakten Organ vornehmen zu können, bei dem die lokalen physiologischen Regulationsmechanismen, wie z.B. Vasoreaktivität und Anpassung von Ventilation und Perfusion, erhalten bleiben. Die Hämodynamik kann kontrolliert werden und relevante physiologische Parameter, wie der Gefäß- oder der Ventilationsdruck sowie die Membranpermeabilität und der Gasaustausch, können messtechnisch erfasst werden. Darüber hinaus können durch die nachfolgende Analyse des verwendeten Perfusates die Mediatorfreisetzung und die metabolischen Veränderungen gemessen werden.

Dem isoliert perfundierten Lungenmodell sind auch Grenzen gesetzt, wie z.B. die fehlende Möglichkeit, Langzeitstudien auf diese Weise durchzuführen. Außerdem kann aufgrund der Komplexität des Lungengewebes keine eindeutige Zuordnung der physiologischen und biochemischen Veränderungen zu den verschiedenen Zelltypen des pulmonalen Parenchyms erfolgen.

Zu den erfassbaren physiologischen Messgrößen der isolierten Herz-Lungen-Präparate gehören die kontinuierlich aufgezeichneten Drücke der Pulmonalarterie und des linken Ventrikels. Veränderungen des ebenfalls kontinuierlich registrierten Ventilationsdruckes spiegeln Änderungen des bronchialen Widerstandes und/oder der Lungencompliance wider. Die kontinuierliche Registrierung des Lungengewichts ermöglicht die ständige Kontrolle der Lungenflüssigkeitsbalance und die Quantifizierung von Flüssigkeitseinlagerungen. Die Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-gestützte Analyse von Perfusatproben, die zu festgelegten Zeitpunkten während des Versuches entnommen werden, ermöglicht eine Bestimmung biochemischer und metabolischer Vorgänge in der Lunge (Seeger et al., 1994).

1.3 “Priming“ der isolierten und blutfrei perfundierten Lunge durch gramnegative Bakterienwandbestandteile

Die klinischen Symptome des ARDS gleichen denen, die bei experimenteller Endotoxämie ausgelöst werden. Tiermodelle, bei denen Lipopolysacharide gramnegativer Bakterien eingesetzt werden, sind eine akzeptierte Methode, um die

komplexen biochemischen und pathophysiologischen Vorgänge aufzuklären, die mit ARDS verbunden sind (Brigham, 1986; Ghosh et al., 1993).

1.3.1 Lipopolysaccharid

Das auch als Endotoxin bezeichnete Lipopolysaccharid (LPS) ist eine Komponente der äußeren Membran der Zellwand gramnegativer Bakterien und wird bei dem Zerfall dieser Bakterien freigesetzt. LPS setzt sich zusammen aus einer Lipid A-Region und einer Polysaccharidregion, die weiter unterteilt werden kann in die O-spezifische Seitenkette und den Polysaccharidkern (Abb. 1). Die O-spezifische Seitenkette bildet den distalen Teil des LPS-Moleküls in Bezug auf die äußere Bakterienmembran und bedingt die spezifische Immunantwort. Die Kette besteht aus einem Polymer von bis zu 50 sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten, die jeweils aus drei bis acht Monosacchariden bestehen und als variabelster Teil des LPS die serologische Spezifität bedingen. Diese LPS-Komponente variiert von Bakterienspezies zu Bakterienspezies, aber auch innerhalb eines Serotyps. Der Polysaccharidkern besteht aus einem äußeren Kern, der mit der O-spezifischen Seitenkette verbunden ist und aus einem inneren Kern, der mit dem Lipid A verbunden ist. Die äußere Kernregion besteht aus fünf Hexosezuckern, die Heterooligosaccharide bilden. Die innere Kernregion enthält 2-Keto-3-desoxyoctonsäure (Kdo) und drei teils phosphorylierte Heptosen. Das Lipid A ist ein Phosphoglycolipid, bestehend aus meist zwei Glucosaminen und einer variierenden Anzahl an Phosphatgruppen und Fettsäureketten. Es verankert das LPS in der Bakterienmembran und repräsentiert diejenige Komponente des LPS, welche die biologischen Effekte bedingt. Studien haben gezeigt, dass isoliertes bakterielles Lipid A und auch synthetisches Lipid A *in vitro* und *in vivo* die gleiche biologische Aktivität aufweisen wie komplettes LPS (Rietschel et al., 1991, 1992, 1993, 1994a, 1994b).

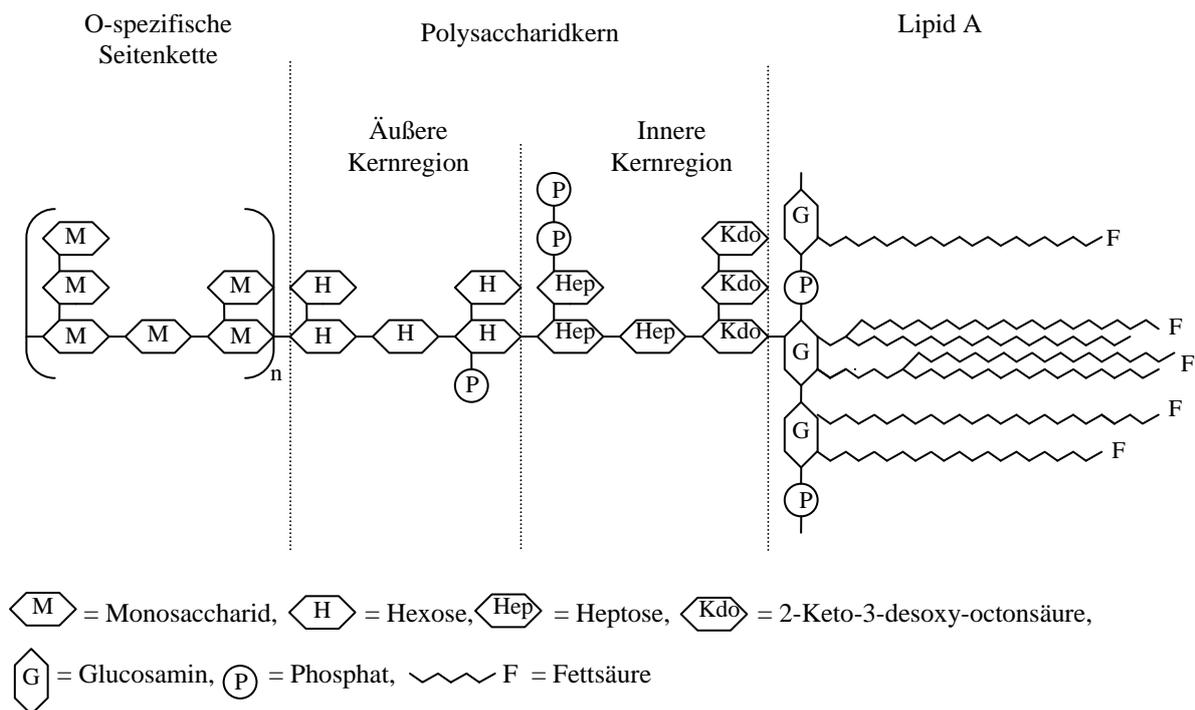


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur eines Lipopolysaccharidmoleküls (LPS). LPS weist drei Teilkomponenten auf, die O-spezifische Seitenkette mit repetierenden Monosaccharideinheiten, den Polysaccharidkern mit der äußeren Kernregion aus verschiedenen Hexosen und der inneren Kernregion aus 2-Keto-3-desoxy-octonsäure (Kdo) und Heptosen, sowie das Lipid A bestehend aus Glucosaminen und einer variierenden Anzahl an Phosphatgruppen und Fettsäureketten.

Die durch Endotoxine hervorgerufenen Organschädigungen resultieren dosisabhängig teils aus der direkten Schädigung durch das Endotoxin, teils aus der LPS-induzierten Reaktion des Körpers. Die humorale und zelluläre Antwort des Organismus auf Endotoxine kann zu unkontrollierter, überschießender Produktion von zahlreichen Metaboliten wie Prostaglandinen, Thromboxanen, Leukotrienen und Komplementfaktoren führen. Diese Metabolite sind in der Lage, den Beginn eines *Circulus vitiosus* von inflammatorischen Antworten und Organschäden auszulösen (Ghosh et al., 1993). Die durch LPS ausgelösten Mikrozirkulationsstörungen, Zell- und Organschäden werden durch die Aktivierung von Entzündungszellen wie Monozyten, Makrophagen und die nachfolgende Produktion von endogenen Mediatoren wie Zytokinen, z.B. Interleukin (IL)-1, IL-6 und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) (Schletter et al., 1995; Olson et al., 1988; Sutherland, 1985) sowie Eikosanoiden, hierbei vor allem Thromboxanen und Prostaglandinen (Ermert et al., 2000c) hervorgerufen.

Es wurde gezeigt, dass niedrige Dosen von LPS Entzündungszellen *in vitro* stimulieren und eine verstärkte Antwort auf sekundäre inflammatorische Stimuli, wie spezielle als chemische Lockstoffe wirkende Peptide, Lipide und Kohlenhydrate, z.B. Arachidonsäure oder Zymom, bewirken (Aderem et al., 1986; Doerfler et al., 1989; Forehand et al., 2003; O'Sullivan et al., 1992; Suttorp et al., 1987). Dieser "Priming"-Effekt konnte auch bei blutfrei perfundierten Lungen festgestellt werden (Ermert et al., 2000c; Salzer et al., 1990; Steudel et al., 1997; Walmrath et al., 1993, 1994a, 1994b). Beim alleinigen Zusatz von LPS zum rezirkulierenden Perfusat isolierter Lungen konnten keine Veränderungen der funktionalen Variablen wie der pulmonalen Vasomotion oder Ventilation festgestellt werden, aber es kam zu einer gesteigerten Reaktion auf einen sekundären Stimulus, wie z.B. den plättchenaktivierenden Faktor (Salzer et al., 1990), Arachidonsäure (AA) (Steudel et al., 1997) oder Exotoxine wie das *Staphylococcus aureus*-spezifische α -Toxin (Walmrath et al., 1993) oder das *Escherichia coli*-spezifische Hämolysin (Walmrath et al., 1994a, 1994b). Die Reaktion äußerte sich in einer verstärkten Vasokonstriktion, einer Ödembildung und Bronchokonstriktion. Für dieses Phänomen wurde die vermehrte Thromboxan A₂ (TXA₂)-Produktion, ausgelöst durch die Hochregulation der Zyklooxygenase (Cox)-2, verantwortlich gemacht (Ermert et al., 2000b, 2000c; Liu et al., 1996; Schütte et al., 1997; Steudel et al., 1997; Walmrath et al., 1994a, 1996). Die mit der erhöhten Thromboxanbildung zusammenhängende Vasokonstriktion in mit LPS "geprimten" Lungen wurde auch mit den gleichzeitig auftretenden schweren Ventilations-Perfusions-Störungen in Zusammenhang gebracht (Seeger et al., 1989b; Walmrath et al., 1994b).

1.3.2 Lipopolysaccharid-Rezeptoren

Viele der durch LPS ausgelösten, zellulären Effekte scheinen von dem Plasmaprotein LPS-bindendes Protein (LBP) und membranständigem CD14 (mCD14) als Rezeptor abhängig zu sein (Lamping et al., 1998; Le Roy et al., 1999; Liu et al., 1994; Martin et al., 1992; Pugin et al., 1993; Tobias et al., 1995; Ulevitch, 1991; Wright et al., 1990b; Wurfel et al., 1997). Das im Serum vorhandene LBP erkennt das LPS und verstärkt die Erkennung von LPS durch Makrophagen, indem es mit LPS und CD14 einen LPS-bindenden Komplex bildet (Hailman et al., 1994;

Wurfel et al., 1994) (Abb. 2). CD14 ist ein Rezeptor mit hoher Affinität zu LPS, der entweder über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran von Makrophagen und Monozyten verbunden ist und als mCD14 bezeichnet wird oder sich bei Fehlen von GPI in löslicher Form im Serum befindet und als lösliches CD14 (sCD14) bezeichnet wird. Der lösliche Rezeptor sCD14 kann sich mit dem LPS/LBP-Komplex verbinden und die Aktivierung von CD14-negativen Zellen, denen mCD14 fehlt (z.B. Endothel- und Epithelzellen), bewirken (Frey et al., 1998; Pugin et al., 1993). Zusätzlich zu diesem LBP-CD14-Weg wurde jedoch auch ein Plasmakomponenten- und CD14-unabhängiger Signaltransduktionsweg für Endotoxine beschrieben (El Samalouti et al., 1999; Ingalls und Golenbock, 1995; Lynn et al., 1993; Wright et al., 1990b). Die Struktur von CD14 zeigte, dass CD14 nicht direkt die zelluläre Aktivierung durch LPS bewirken kann, da eine Transmembranregion fehlt (El Samalouti et al., 1999; Lee et al., 1993). Es wurde nach einem Membranprotein gesucht, welches intrazelluläre Signale übermitteln kann.

Unabhängig davon wurde in Studien der angeborenen Immunität von *Drosophila* der Transmembranrezeptor Toll entdeckt, der die dorsoventrale Achsenformation in Fruchtfliegenembryos kontrolliert (Anderson, 2000; Hashimoto et al., 1988) und bei adulten Fruchtfliegen eine Rolle bei der Pilzabwehr spielt (Meng et al., 1999; Rutschmann et al., 2000). Homologe des Tollrezeptors wurden für Säugetiere identifiziert und als „Toll-like receptor“ (TLR) bezeichnet, der Immunantworten auf verschiedene Mikrobenstimuli vermittelt (Rock et al., 1998). TLRs beinhalten eine Familie von Typ I Transmembranrezeptoren, die charakterisiert sind durch eine extrazelluläre leucine rich repeat (LLR)-Domäne und eine intrazelluläre Domäne, die zum menschlichen IL-1-Rezeptor homolog ist und daher als Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet wird (Hashimoto et al., 1988; Medzhitov et al., 1997; Rock et al., 1998). Bis jetzt sind 13 verschiedene Rezeptoren für Säugetiere identifiziert worden, die zu der TLR-Familie zu rechnen sind, 12 bei Mäusen und 10 beim Menschen (Beutler, 2004; Tabeta et al. 2004). Der TLR4 gilt mittlerweile als derjenige Rezeptor innerhalb eines Rezeptorkomplexes für LPS, der die intrazelluläre Signaltransduktion vermittelt (Beutler, 2000; Hirschfeld et al., 2000; Hoshino et al., 1999; Lien et al., 2000; Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999; Underhill et al., 1999). Es gibt Hinweise, dass TLR4 direkt mit LPS in Wechselwirkung treten kann

(Lien et al., 2000; Poltorak et al., 2000), wobei diese Wechselwirkung eindeutig durch CD14 und ein weiteres Protein, MD-2 genannt, unterstützt wird (da Silva et al., 2001; Jerala, 2007; Myiake, 2004). MD-2 ist ein kleines Cystein-reiches Glykoprotein, dem eine Transmembranregion fehlt, und das sich auf der Zelloberfläche von Makrophagen zusammen mit der Ektodomäne von TLR4 darstellt (Shimazu et al., 1999) (Abb. 2). Obwohl seine genaue Funktion nicht bekannt ist, wird MD-2 für die LPS-Erkennung durch TLR4 (Schromm et al., 2001) und für die nachfolgende Aktivierung des durch Mitogene aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signaltransduktionsweges (Yang et al., 2000) benötigt. Es scheint ebenso wie TLR4 ein entscheidendes Molekül im LPS-Rezeptorkomplex zu sein, da Mäuse, denen entweder TLR4 oder MD-2 fehlt, nicht auf LPS reagieren (Hoshino et al., 1999; Nagai et al., 2003).

Die CD11/CD18 β_2 -Integrine stellen eine weitere Gruppe von membranständigen LPS-Rezeptoren dar, die in Zusammenhang mit der Vermittlung der LPS-Wirkung eine Rolle spielen (Abb. 2). CD11/CD18 β_2 -Integrine repräsentieren eine Familie obligat heterodimerer Glykoproteine, die auf Makrophagen exprimiert werden, und zwar in Form einer CD18 β_2 -Untereinheit, die nicht-kovalent mit einer der drei α -Untereinheiten z.B. CD11a, CD11b oder CD11c verbunden ist (Todd et al., 1997). Obwohl alle drei Typen der β_2 -Integrine auf Makrophagen zu finden sind, exprimieren Makrophagen hauptsächlich CD11b/CD18 β_2 -Heterodimere, die auch als CR3 bezeichnet werden. Die CD11b/CD18 β_2 -Integrine wurden ursprünglich in Studien, welche die Bindung gramnegativer Bakterien und LPS-bedeckter Erythrozyten an diese Rezeptoren von humanen Makrophagen demonstrierten, als LPS-Rezeptoren identifiziert (Wright et al., 1986). Einen direkten Beweis für die Ligandenbindungsrolle von CD11/CD18 β_2 bei der LPS-Signaltransduktion lieferten dann Ingalls et al. (1995, 1997). Sie fanden heraus, dass CD11/CD18 β_2 eine LPS-Antwort unabhängig von CD14 ermöglicht (Ingalls und Golenbock, 1995; Ingalls et al., 1997), auch wenn CD11/CD18 β_2 nicht essentiell für die zelluläre Antwort auf LPS ist (Wright et al., 1990a), und CD14 sensibler und schneller auf LPS zu reagieren scheint (Ingalls und Golenbock, 1995; Ingalls et al., 1997). Wie bei dem Rezeptor CD14 steigert das LBP auch bei CD11/CD18 β_2 die LPS-induzierte zelluläre Aktivierung (Ingalls et al., 1998; Wright et al., 1989). Des Weiteren wurde über eine transiente Bindung von CD14 mit CD11b/CD18 β_2 bei der Antwort auf LPS in Neutrophilen berichtet (Zarewych et al.,

1996) und nach Perera et al. (2001) wird für die optimale Genexpression von Cox-2, IL-12p35 und IL-12p40 als Antwort auf LPS oder Taxol die Beteiligung aller drei Rezeptoren, CD11b/CD18 β_2 , CD14 und TLR4, benötigt, wobei die Autoren eine Interaktion aller drei Rezeptoren in einem Rezeptorkomplex vermuten.

Ein weiterer LPS-Rezeptor wurde in CD55 gefunden, auch decay accelerating factor (DAF) genannt. Es ist ein Regulatormolekül der Komplementkaskade und auf fast allen Zellen vorhanden, die in Kontakt mit dem Blutstrom stehen (Kunsch et al., 1994; Nishizuka, 1995). Obwohl CD55 ähnlich wie mCD14 über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist, wurde wiederholt seine Beteiligung an der Signaltransduktion in T-Zellen und Monozyten gezeigt (Davidson et al., 2002; Simons et al., 1991; Smith et al., 1981; Taylor et al., 1995). CD55 kann LPS und Lipid A bei Vorhandensein von LBP und sCD14 binden (El-Samalouti et al., 1999). Eine von Heine et al. (2001) durchgeführte Transfektion von LPS-hyporesponsiven Chinese hamster ovary (CHO)-Zellen mit humanem CD55 resultierte in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor κ B (NF κ B) als Antwort auf eine Stimulation mit LPS oder Lipid A, was CD55 als ein Molekül darstellt, das in der Lage ist, eine LPS-induzierte Aktivierung von Zellen zu bewirken und Teil eines multimeren LPS-Rezeptorkomplexes sein könnte (Heine et al., 2001).

Unter den weiteren potentiellen Molekülen, die an der LPS-induzierten Signaltransduktion mit nachfolgender Genexpression beteiligt sein könnten, werden kleine G-Proteine (Schwartz et al., 1995), das Hitzeschockprotein 90 (Byrd et al., 1999) und noch andere, mit der durch LPS ausgelösten Makrophagenaktivierung in Verbindung gebrachte Proteine diskutiert.

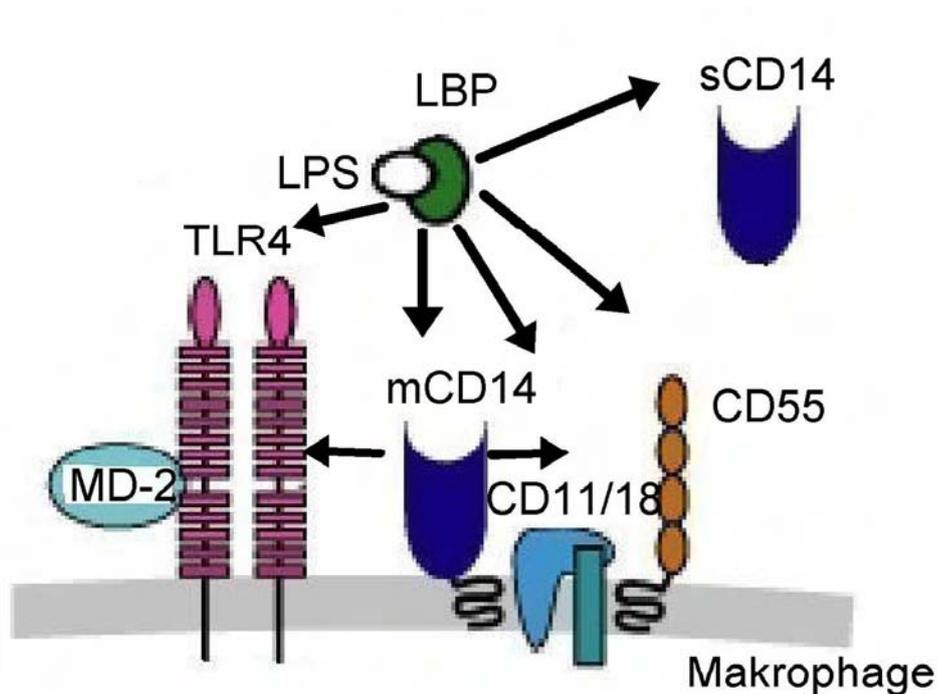


Abbildung 2: Darstellung der Bindungsmöglichkeiten von Lipopolysaccharid (LPS) an seine Rezeptoren.

LPS kann alleine oder gebunden an LPS-bindendes Protein (LBP) an das membranständige CD14 (mCD14) oder lösliches CD14 (sCD14), den Toll-like receptor (TLR) 4/MD-2-Komplex, CD11/CD18 β_2 oder CD55 übertragen werden. Der Rezeptor CD14 kann zusammen mit CD55, CD11/CD18 β_2 oder TLR4 im Komplex wirken. (Modifiziert nach Bendtzen, 2004).

1.3.3 Lipopolysaccharid-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion

LPS löst in Makrophagen die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden unter Einbeziehung von G-Proteinen, Tyrosinkinassen, der Phospholipase C (PLC), Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und der Mitogen aktivierten Proteinkinassen (MAPK) aus (Fujihara et al., 1994; Liu et al., 1994; Shapira et al., 1994; Sweet und Hume, 1996).

Die PKA, auch cAMP-abhängige Proteinkinase genannt, trägt diesen Namen, da sie in ihrer Aktivierung von dem sekundären Messengermolekül zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) abhängig ist. Das Enzym ist ein Heterotetramer bestehend aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Einheiten. Es sind bisher vier regulatorische Untereinheiten (R α , R β , RII α , RII β) und drei katalytische Untereinheiten (C α , C β , C γ ,) mit Spleißvarianten (C α_2 , C β_2) bekannt (Scott, 1991; Tasken et al., 1993).

Im inaktiven Zustand blockieren die regulatorischen Untereinheiten die katalytischen Zentren. Erfolgt in der Zelle aufgrund eines externen Stimulus über einen G-Protein-abhängigen Prozess eine Aktivierung der Adenylatzyklase, welche Adenosintriphosphat (ATP) in cAMP umwandelt, so steigt die cAMP-Konzentration in der Zelle an und durch die kooperative Bindung von zwei Molekülen cAMP an je eine R-Untereinheit dissoziiert das Enzym in ein Dimer aus regulatorischen und katalytischen Untereinheiten. Die freien katalytischen Untereinheiten sind damit aktiv und können Substrate im Zytosol und Zellkern phosphorylieren (Abb. 3).

In einigen Studien wird beschrieben, dass die Behandlung von Makrophagen mit LPS eine Aktivierung der PKA bewirken kann (Fujihara et al., 1993; Fournier et al., 1995; Muroi und Suzuki 1993).

Auch die Proteinkinase C Serin/Threoninkinase scheint bei der LPS-Signalweiterleitung und Regulation der nachfolgenden Cox-2-Expression eine wichtige Rolle einzunehmen. Die PKC-Familie besteht aus 12 verschiedenen Isoformen, die basierend auf ihrer Primärstruktur und ihren Aktivierungsvoraussetzungen in drei Gruppen eingeteilt werden, die Gruppe der konventionellen, der neuen und der atypischen PKCs (Dekker und Parker, 1994; Hug und Sarre, 1993).

Die konventionellen PKCs, welche die Isoformen α , β I, β II und γ einschließen, benötigen Ca^{2+} und Diacylglycerin (DAG) für die Aktivierung und Phosphatidylserin (PS) als Kofaktor. Die Gruppe der neuen PKCs wird gebildet von den Isoformen δ , ϵ , η , θ und μ , die DAG und PS für die Aktivierung brauchen, jedoch kein Ca^{2+} . Die atypischen PKCs, zu denen die Isoformen ζ , ι und λ gehören, können nicht durch DAG oder Ca^{2+} aktiviert werden, sondern benötigen Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP_3), Zeramid und PS (Akimoto et al., 1996; Lozano et al., 1994; Nakanishi et al., 1993).

Die PKC besitzt eine katalytische und eine regulatorische Domäne. Die regulatorische Einheit der klassischen PKCs beinhaltet zwei konservierte Regionen. Die C1-Region, die DAG, PS und Phorbolester bindet und die C2-Region, die Ca^{2+} bindet. Die neuen und die atypischen PKCs besitzen lediglich die C1-Region und

sind daher bei ihrer Aktivierung nicht von Ca^{2+} abhängig. Die atypischen PKCs sind zusätzlich nicht von DAG abhängig.

Die katalytische Einheit der PKC setzt sich aus der hochkonservierten C3- und C4-Region zusammen. Die C3-Region beinhaltet eine Übereinstimmungssequenz für die ATP-Bindung, während die C4-Region verantwortlich ist für die Proteinsubstrat-Bindung.

Das inaktive Enzym befindet sich vorwiegend im Zytosol. In diesem Zustand wirken die Pseudosubstratsequenz der regulatorischen Einheit der PKC und die katalytische Einheit aufeinander ein und verhindern so den Zugang des Substrats zur regulatorischen Einheit. Die Bindung eines Effektormoleküls an den Membranrezeptor bewirkt über ein G-Protein-abhängiges Phänomen eine Aktivierung der Phospholipase A_2 (PLA_2) oder PLC. Die aktivierte PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat (PIP_2), um DAG und Inositol-(1,4,5)-triphosphat (IP_3) zu bilden. IP_3 bewirkt die Freisetzung von endogenem Ca^{2+} , welches an die zytosolische PKC bindet und die Phospholipidbindungsseite freilegt. Die Bindung von Ca^{2+} führt zur Translokation der PKC zur Membran, wo sie mit DAG interagiert und in ein aktives Enzym transformiert wird (Abb. 3). Auch die durch PLA_2 freigesetzte Arachidonsäure (AA) aktiviert die zytosolische PKC (Basu, 1993; Black, 2000; Blobel et al., 1994; Cooper et al., 1991; Gopalakrishna et al., 1992; Gopalakrishna und Jaken, 2000; Hanks und Hunter, 1995; Musashi et al., 2000; Newton, 1995; Nishizuka, 1995; Rasmussen et al., 1995; Taylor et al., 1995; Walaas und Greengard, 1991; Wright et al., 1990b; Yamamoto et al., 1998).

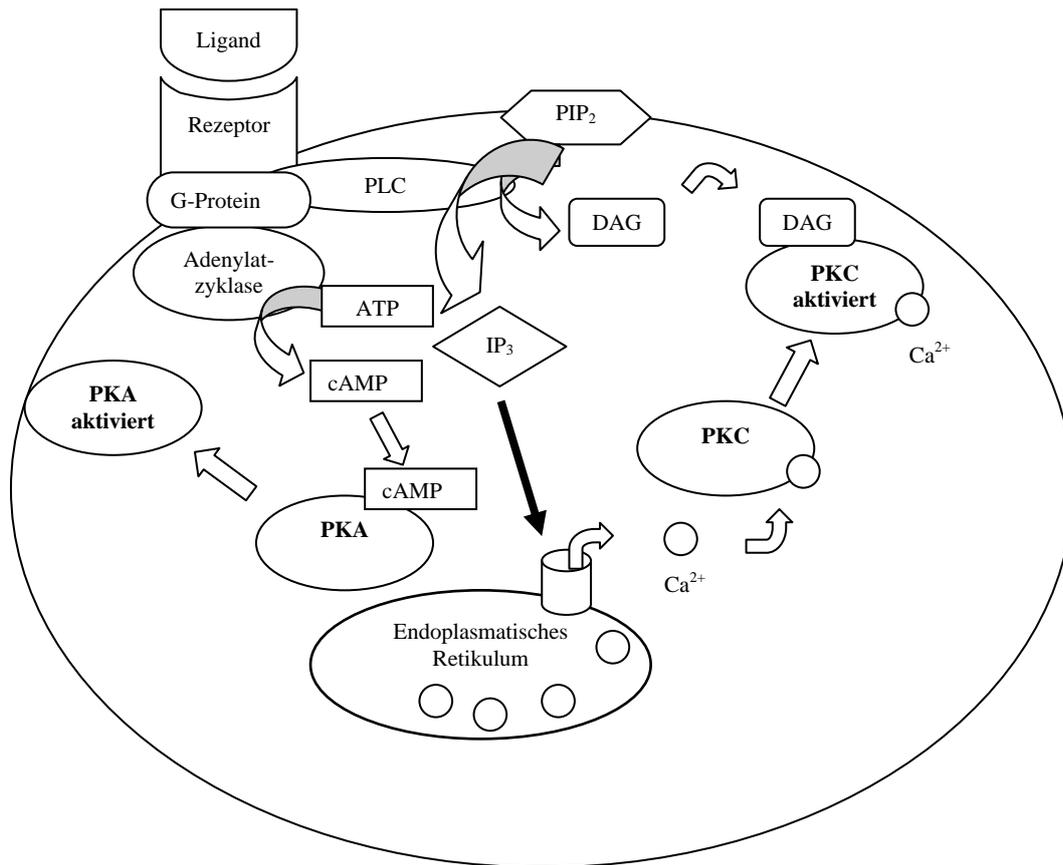


Abbildung 3: Übersicht zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und der konventionellen Proteinkinase C (PKC).

Die Bindung eines Liganden an den Membranrezeptor bewirkt über ein G-Protein-abhängiges Phänomen eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Die aktivierte PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat (PIP₂) um Diacylglycerin (DAG) und Inositol-(1,4,5)-triphosphat (IP₃) zu bilden. IP₃ bewirkt die Freisetzung von endogenem Ca²⁺, welches an die zytosolische PKC bindet und zur Translokation der PKC zur Membran führt, wo sie mit DAG interagiert und in ein aktives Enzym transformiert wird. Die Bindung eines Liganden an den Membranrezeptor veranlasst G-Protein-abhängig eine Aktivierung der Adenylatzyklase, welche aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bildet und intrazelluläres cAMP ansteigen lässt. Die Bindung von cAMP an die Proteinkinase A führt zur ihrer Aktivierung.

In zahlreichen Studien ist die Beteiligung einzelner PKC-Isoenzyme an der Signalweiterleitung in mit LPS stimulierten Zellen untersucht worden, wobei ihnen in der Signalkaskade häufig eine der MAPK-Aktivierung vorgeschaltete Rolle zugeschrieben wird.

In mehreren Studien (Castrillo et al., 2003; Mestre et al., 2001; Monick et al., 1999, 2000) wird dabei der PKC ζ eine zentrale Rolle in der Aktivierung der MAPK-Signaltransduktion zugewiesen.

Auch die Aktivierung von PKC ϵ wird in einer Reihe von Studien als ein entscheidender Schritt in der Signalantwort von Makrophagen (Castrillo et al., 2001; Comalada et al., 2003; Lin et al., 1996; Shapira et al., 1997; Valledor et al., 2000), Dendritenzellen (Aksoy et al., 2002, 2004) und Kardiomyozyten (Li et al., 2000) auf LPS bezeichnet. Untersuchungen mit PKC ϵ -defizienten Mäusen zeigten, dass bei ihnen die LPS-induzierte Translokation von NF κ B ernsthaft gestört ist, und dass sie nach intravenöser Verabreichung von grampositiven und gramnegativen Bakterien eine stark reduzierte Überlebenszeit haben (Castrillo et al., 2001).

Bei der LPS-Signalweiterleitung in Makrophagen soll auch PKC β eine wichtige Rolle spielen (Fujihara et al., 1994; Shinji et al., 1994).

Ebenso wird der PKC α in einigen Studien eine regulierende Funktion bei der Modulation der Makrophagen durch LPS bestätigt. In verschiedenen Untersuchungen mit Makrophagen konnte ihre Aktivierung durch LPS und ihre Beteiligung an der durch LPS ausgelösten Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxydsynthase iNOS und Cox-2 (Chen et al., 1998; Chano und Descoteaux, 2002; Giroux und Descoteaux, 2000; St-Denis et al., 1998) nachgewiesen werden.

Bei der durch LPS ausgelösten Signaltransduktion werden nachfolgend verschiedene MAPK-Kaskaden aktiviert (Carter et al., 1999; Geppert et al., 1994; Hambleton et al., 1996; Reimann et al., 1994; Weinstein et al., 1992) (Abb. 5).

Die MAPK sind eine Familie von evolutionär konservierten Enzymen, welche die Zelloberflächenrezeptoren mit den regulatorischen Einheiten verbinden, die sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Proteine einschließen. Die drei Haupt-MAPK-Familien sind bei der LPS-Signaltransduktion beteiligt (Carter et al., 1999; Mancuso et al., 2002; Matsuguchi et al., 2001). Im Einzelnen sind dies die Extrazellulär signalregulierte Kinase (ERK) 1 und 2 (Reimann et al., 1994; Weinstein et al., 1992), auch als p42/44-MAPK bezeichnet, die c-Jun aminoterminal Proteinkinase (JNK) 1, 2 und 3 (Kyriakis und Avruch, 2001), die auch als Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) und die p38-MAPK α , β , γ und δ bekannt ist (Sanghera et al., 1996).

Nach einer Studie von Mestre et al. (2001) mit von Makrophagen und Monozyten abstammenden Zellen induziert LPS über verschiedene MAPK- und PKC-Signaltransduktionswege eine Steigerung der nachfolgend erläuterten Cox-2-Genexpression. Dabei spielt die Bindung der Transkriptionsfaktoren Nukleärer Faktor κ B (NF κ B), Nukleärer Faktor Interleukin-6 (NF-IL6) und des cyclic adenosinmonophosphate responsive element (CRE) an ihre spezifischen Promotorsequenzen eine entscheidende Rolle. LPS kann demnach über verschiedene MAPK-Wege die Transkription des Cox-2-Gens bewirken. Zum einen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B über den ERK2-, p38-MAPK- und JNK-Weg, zum anderen durch NF-IL6 über den p38-MAPK-Weg und zuletzt durch CRE über den ERK2- und JNK-Weg. Darüberhinaus scheint LPS über PKC ζ durch die Aktivierung aller drei genannten Transkriptionsfaktoren die Induktion der Cox-2-Genexpression zu vermitteln.

Ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der durch LPS induzierten zytokinen Genexpression ist der bereits oben erwähnte NF κ B (Collart et al., 1990; Matsusaka 1993; Zhang et al., 1993), der an Zytokin-spezifische Promotorsequenzen bindet (Goldfeld et al., 1991; Kunsch et al., 1994; Shakhov et al., 1990). In neueren Studien konnte bei Mäusen eine LPS-induzierte, NF κ B-abhängige vermehrte Expression des TLR2 der Lunge nachgewiesen werden (Matsuda et al., 2008). Eine Arbeit von Moine et al. (2000) zeigt, dass Patienten mit ARDS eine gesteigerte Aktivierung von NF κ B in Alveolarmakrophagen aufweisen, was zu der gesteigerten Expression immunoregulatorischer Zytokine und proinflammatorischer Mediatoren beitragen könnte, die das ARDS charakterisieren.

1.3.4 Zellspezifische Effektorsysteme des "gramnegativen Primings"

Zu den zellspezifischen Effektorsystemen des "gramnegativen Primings" ist die Zyklooxygenase (Cox) zu rechnen, von der seit Längerem zwei Isoformen bekannt sind, die Cox-1 und Cox-2, welche beide die Umwandlung von Arachidonsäure (AA) in verschiedene Eikosanoide katalysieren (Steudel et al., 1997; Uhlig et al., 1997). Dazu gehören die Eikosanoide Thromboxan A₂ (TXA₂), Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Prostazyklin (PGI₂) (Abb. 4). Die aus AA entstehenden, aktiven Metabolite werden für

die messbaren Reaktionen in der Lunge, wie Änderungen des pulmonalvaskulären Druckes und des Ventilationsdruckes, verantwortlich gemacht (Seeger et al., 1986; Grimminger et al., 1995; Walmrath et al., 1994b).

Kürzlich wurde in caninem Zellgewebe ein weiteres Cox-Isoenzym beschrieben und als Cox-3 bezeichnet (Chandrasekharan et al., 2002). Da es sich dabei jedoch lediglich um eine Variante der Cox-1 handelt, bei der das Intron-1 aus der messenger-RNA nicht entfernt wurde, lehnen andere Arbeitsgruppen diese Bezeichnung ab und bevorzugen die Bezeichnung Cox-1b (Davies et al., 2004; Snipes et al., 2005) oder Zyklusooxygenase-1-Variante (Cox-1v) (Dou et al., 2004).

Daneben konnten weitere Spleiß-Varianten der Cox-1 identifiziert werden, die kleineren, partiellen Cox (pCox) pCox-1a und pCox-1b in caninem Zellgewebe (Chandrasekharan et al., 2002) und die sogenannte Cox-1b₁, Cox-1b₂ und Cox-1b₃ in humanem Zellgewebe (Qin et al., 2005).

Die Zyklusooxygenase katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinendoperoxiden, welche die Vorläufer einer Reihe biologisch aktiver Komponenten sind. Die Zyklusooxygenaseaktivität des Enzyms führt zur Bindung von zwei Sauerstoffmolekülen an die Arachidonsäure, um Prostaglandin G₂ (PGG₂) zu bilden. Die Peroxidaseaktivität des Enzyms schließlich reduziert PGG₂ zu seinem 15-Hydroxy-Analog Prostaglandin H₂ (PGH₂) (Abb. 4).

PGH₂ wird hauptsächlich durch eine Thromboxansynthase (TX-Synthase) zu TXA₂ umgewandelt (Holtzmann, 1991) (Abb. 4). In immunhistologischen Studien, konnte gezeigt werden, dass während des "LPS-Primings" gleichzeitig mit der Hochregulation der Cox-2 auch eine Hochregulation der TX-Synthase erfolgte und zwar vor allem in den vaskulären und bronchialen glatten Muskelzellen (Ermert et al., 2000a, 2000b). Das von der TX-Synthase gebildete TXA₂ ist ein potenter Konstriktor von Gefäßen und glatter Muskulatur der Atemwege, der die Thrombozytenaggregation fördert. TXA₂ wird in Verbindung gebracht mit der Pathogenese von Lungenkrankheiten, wie pulmonaler Hypertension, Asthma und ARDS (Ogletree, 1987; Shore et al., 1989). In vielen Tiermodellen wird bei experimentell erzeugter Endotoxämie die pulmonale Hypertension hauptsächlich

durch die TXA₂-Synthese ausgelöst (Nüsing und Ullrich, 1990; Seeger et al., 1989b). Für TXA₂ ist eine Beteiligung an der pulmonalen Hypertension bei Kaninchen (Seeger et al., 1989a) und einer Hyperreaktivität der Atemwege bei Hunden (O'Byrne et al., 1985) nachgewiesen worden. TXA₂ hydrolysiert spontan zu Thromboxan B₂ (TXB₂), welches im Gegensatz zu der instabilen Ursprungsverbindung nicht in der Lage ist, die Kontraktion glatter Muskelzellen und die Thrombozytenaggregation zu veranlassen.

Darüberhinaus wird PGH₂ in vaskulären Endothelzellen sowie vaskulären und nichtvaskulären glatten Muskelzellen durch die Prostazyklinsynthase (PGI-Synthase) in Prostazyklin (PGI₂) umgewandelt, einen Enoläther, der spontan zu 6-keto-Prostaglandin F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) hydrolysiert (Abb. 4). PGI₂ ist verantwortlich für die Arachidonsäure-induzierte Vasodilatation (Holtzmann, 1991; Ogletree, 1982) und für den antiaggregatorischen Einfluss auf Thrombozyten (Holtzmann, 1991).

Im Kaninchenmodell übersteigt die vasokonstriktorische Potenz von TXA₂ deutlich den vasodilatatorischen Effekt von PGI₂ bei durch verschiedene Agenzien ausgelöster gleichzeitiger Freisetzung vergleichbarer TXA₂- und PGI₂-Konzentrationen in das Gefäß- und Alveolarkompartiment (Seeger et al., 1987, 1989a).

Durch die Prostaglandinsynthase (PGE-Synthase) wird PGH₂ in verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Makrophagen, zu Prostaglandin E₂ (PGE₂) isomerisiert (Abb. 4). PGE₂ ist unter anderem dazu in der Lage, Pulmonalgefäße zu kontrahieren (Janssen und Tazzeo, 2002; Ogletree 1982). Die Wirkungen von PGE₂ werden über verschiedene Prostaglandin E₂-Rezeptoren (EP) 1-4 vermittelt (Narumiya und FitzGerald, 2001). In der Lunge wirkt PGE₂ über EP₃ als Vasokonstriktor der Pulmonalarterien (Norel et al., 2004) und über EP₁ der Pulmonalvenen (Walch et al., 2001). Die glatte Muskulatur der Atemwege wird durch den Rezeptor EP₂ vermittelt relaxiert (Norel et al., 1999). Die durch PGE₂ bewirkte bronchiale Muskelrelaxation wird durch einen direkten Effekt und durch die Hemmung von Acetylcholin erreicht (Walters et al., 1984). PGE₂ hemmt außerdem die Adhärenz der Neutrophilen und die durch Neutrophile vermittelte Endothelzellschädigung (Holtzmann, 1991).

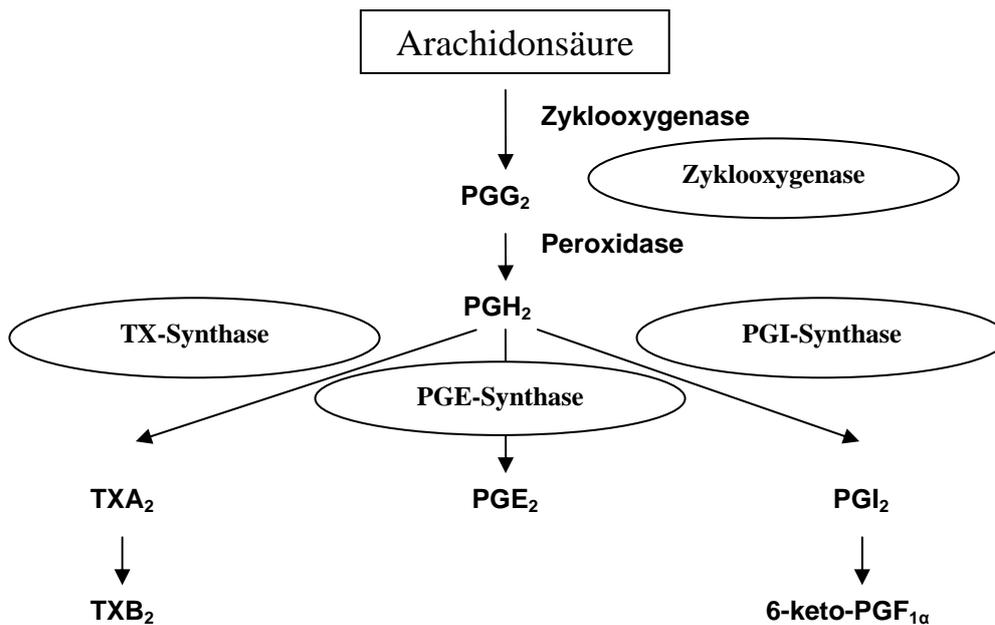


Abbildung 4: Bildung der Eikosanoide Thromboxan A₂ (TXA₂), Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Prostazyklin (PGI₂) aus Arachidonsäure.

Arachidonsäure wird durch eine Zylooxygenase katalysiert in Prostaglandin G₂ (PGG₂) und weiter in Prostaglandin H₂ (PGH₂) umgewandelt. Aus PGH₂ wird unter anderem über eine Thromboxansynthase (TX-Synthase) TXA₂ gebildet, das spontan zu Thromboxan B₂ (TXB₂) hydrolysiert; durch eine Prostazyklinsynthase (PGI-Synthase) entsteht PGI₂, welches zu 6-keto-PGF_{1α} hydrolysiert und eine Prostaglandinsynthase (PGE-Synthase) katalysiert die Umwandlung zu PGE₂.

Bisher nahm man an, dass Cox-2 nur unter Entzündungsbedingungen exprimiert wird, während Cox-1 konstitutiv vorhanden ist (Feng et al., 1993; Lee et al., 1992).

Ermert et al. (1998b) zeigten, dass in Rattenlungen Cox-2 ebenfalls konstitutiv exprimiert wird und zwar in verschiedenen pulmonalen Zelltypen einschließlich der Bronchialepithelzellen, Zellen der glatten Muskulatur der Bronchien, Makrophagen und mastzellähnlichen Zellen in der Nähe des Bronchialepithels und in dem perivaskulären Bindegewebe sowie in glatten Muskelzellen der großen Hilumvenen und der partiell muskulären Gefäße, die als Gefäße des pulmonalen Widerstandes wirken (Meyrick et al., 1978).

Cox-1 dagegen findet sich hauptsächlich in Bronchialepithelzellen, glatten Muskelzellen der großen Hilumvenen und in geringerem Ausmaß in Alveolarmakrophagen und Endothelzellen der Pulmonalarterie.

Übereinstimmend mit diesen morphologischen Daten konnte auch gezeigt werden, dass die durch Arachidonsäure in unstimulierten Lungen ausgelöste vasokonstriktorische Reaktion größtenteils über die Cox-2- und nicht die Cox-1-Aktivität vermittelt wird (Ermert et al., 1998a). Auch in mit LPS "geprimten" Lungen konnte festgestellt werden, dass die Antwort auf einen sekundären Stimulus mit gesteigerter Vasokonstriktion, Ödembildung und Bronchokonstriktion fast ausschließlich durch die hochregulierte Aktivität der Cox-2 ausgelöst wird, während die Aktivität der Cox-1 unverändert bleibt (Ermert et al., 2000b, 2000c).

Neben der TX-Synthase und Cox-2 wird auch die induzierbare Stickstoffmonoxydsynthase (iNOS) als Reaktion auf LPS in Rattenlungen vermehrt exprimiert (Ermert et al., 2002; Shen et al., 2007) (Abb. 5). Der endogene Vasodilatator Stickstoffmonoxyd (NO) wird von drei verschiedenen Isoformen der Stickstoffmonoxydsynthase (NOS) gebildet; zwei davon werden konstitutiv gebildet, nämlich die endotheliale Isoform eNOS und die neuronale Isoform nNOS, während die dritte Isoform in ihrer Expression durch Endotoxin oder Zytokine (Kristof et al., 1998; Moncada und Higgs, 1993) induziert und als iNOS bezeichnet wird. Alle drei Isoformen werden in normalem Lungengewebe produziert (Ermert et al., 2002). Es gibt zahlreiche Hinweise, dass eine gesteigerte NO-Bildung durch die iNOS zu Zirkulationsstörungen durch Vasodilatation und möglicherweise zu den bei Endotoxämie auftretenden Organschäden führt (Cho et al., 2003; Ermert et al., 2002; Mehanna et al., 2007; Ullrich et al., 2001; Wray et al., 1998).

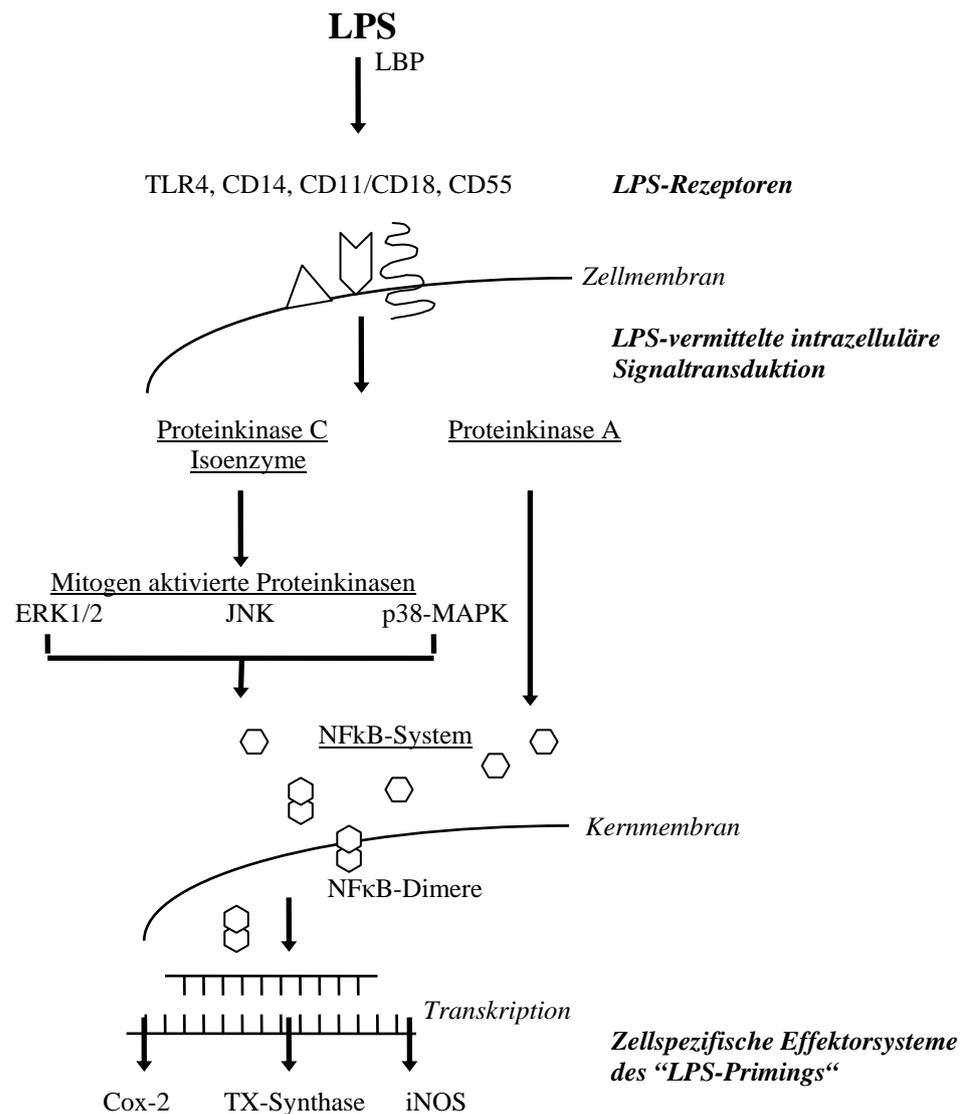


Abbildung 5: Gesamtübersicht zu einer durch LPS ausgelösten potentiellen Signaltransduktionskaskade.

LPS kann alleine oder von dem LPS-bindenden Protein (LBP) gebunden über seine Rezeptoren Toll-like receptor (TLR) 4, CD14, CD11/18 und CD55 intrazelluläre Enzyme aktivieren, wie die Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) Extrazellulär signalregulierte Kinase (ERK) 1 und 2, c-Jun aminoterminaler Proteinkinase (JNK) und p38-MAPK. Die nachfolgende Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor κB (NFκB) führt zu einer vermehrten Expression zellspezifischer Effektorsysteme wie der Cyclooxygenase (Cox)-2, Thromboxansynthase (TX-Synthase) und der induzierbaren Stickstoffmonoxydsynthase (iNOS).

1.3.5 Physiologisch messbare Reaktionen in der isolierten und blutfrei perfundierten Rattenlunge bei "gramnegativem Priming"

Die durch gramnegative Bakterienwandbestandteile ausgelöste "Priming"-Reaktion spiegelt sich bei dem Modell der isolierten Rattenlunge in den aufgezeichneten Messwerten und ELISA-Analysen wider. Erfolgt nach der Verabreichung von LPS ein

ungehinderter Ablauf der Signaltransduktion, so entstehen schließlich erhöhte Mengen an Eikosanoiden, die durch eine ELISA-gestützte Methode im zirkulierenden Perfusionsmedium der Rattenlunge nachgewiesen werden. Diese Eikosanoide bewirken Veränderungen der physiologischen Messwerte, wobei vor allem die vasokonstriktorischen Wirkungen von TXA_2 und PGE_2 in den Vordergrund treten, da sie den gleichzeitig auftretenden vasodilatatorischen Effekt von PGI_2 deutlich übertreffen. Die durch TXA_2 ausgelöste Vasokonstriktion bewirkt eine Steigerung des kontinuierlich aufgezeichneten Druckes der Pulmonalarterie und des linken Ventrikels. Die ebenfalls durch TXA_2 bewirkte vermehrte Bronchokonstriktion und die Veränderungen der Lungencompliance erhöhen den registrierten Ventilationsdruck. Die auf die Wirkung der Eikosanoide zurückzuführende Bildung eines Lungenödems, bedingt durch eine erhöhte kapillarendotheliale und alveolarepitheliale Permeabilität mit Flüssigkeitsansammlungen in den Alveolen, den Bronchioli und dem Interstitium, wird als eine Vergrößerung des Lungengewichts registriert.

Die Auswirkungen der, nach Stimulation der isolierten Rattenlunge durch LPS, in verschiedenen Versuchen verabreichten Inhibitoren auf die beschriebenen Messwerte sowie die ELISA-Analysen lassen Rückschlüsse zu, ob das durch den Inhibitor gehemmte Enzym beziehungsweise Isoenzym an der durch gramnegative Bakterienwandbestandteile ausgelösten intrazellulären Signaltransduktion beteiligt ist.

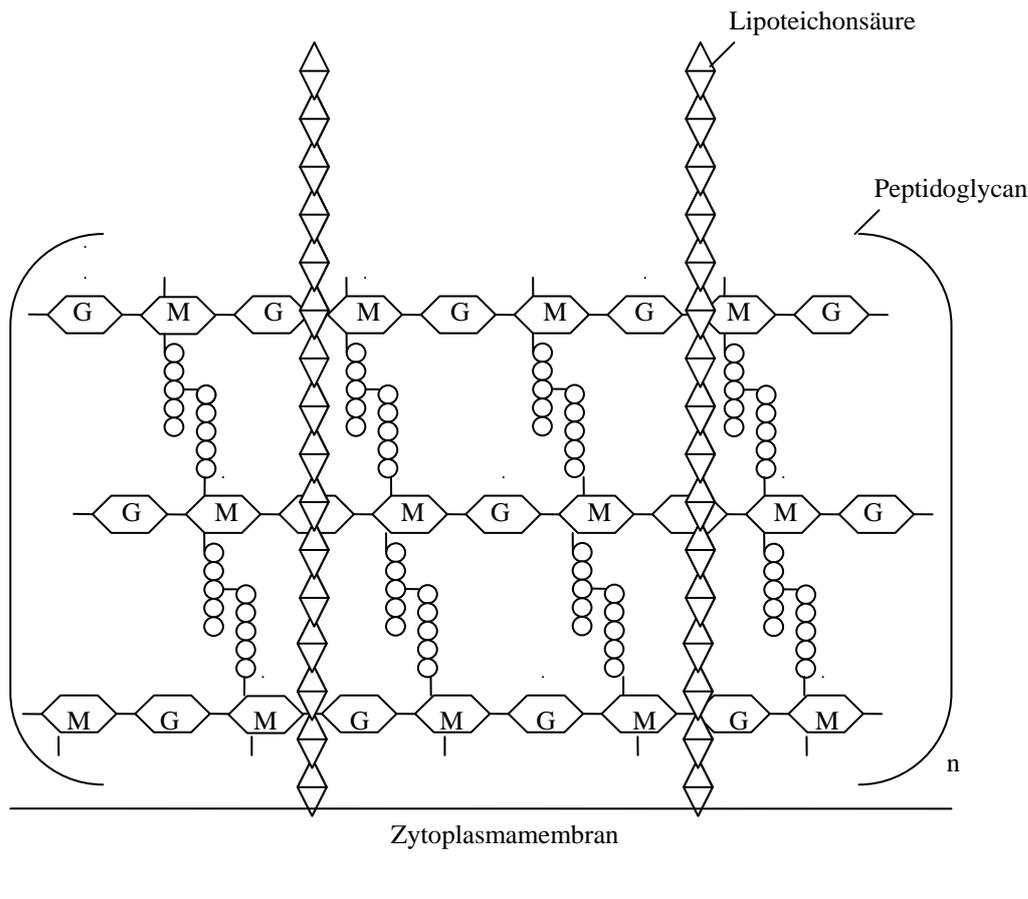
1.4 “Priming“ der isolierten und blutfrei perfundierten Lunge durch grampositive Bakterienwandbestandteile

1.4.1 Lipoteichonsäure und Peptidoglycan

Grampositive Bakterien enthalten kein Endotoxin, trotzdem können sie septischen Schock und Multiorganversagen auslösen (Natanson et al., 1989; Wakabayashi et al., 1991). Verantwortlich dafür sind die Zellwandkomponenten Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglycan (PepG) grampositiver Bakterien.

PepG bildet ungefähr die Hälfte der Zellwandmasse grampositiver Bakterien (Schleifer und Kandler, 1972). Auch gramnegative Bakterien enthalten PepG in ihrer Zellwand, allerdings nur als dünne Schicht unter 10 nm Dicke, z.B. 1-3 nm bei *Escherichia coli* (Vollmer und Höltje, 2004), während bei grampositiven Bakterien ein PepG-Gerüst aus mehreren Schichten mit 20-40 nm Gesamtstärke (Giesbrecht et al., 1998) die Zellwandhauptstrukturkomponente bildet. Es ist ein Peptidoglycan bestehend aus zwei linearen Polysaccharidketten, alternierend aus N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin zusammengesetzt, die durch kurze Peptide quervernetzt sind (Abb. 6). Zwischen den verschiedenen Bakterienspezies bestehen Unterschiede in den Peptiduntereinheiten, während die Zuckerketten hochkonserviert sind. Die Peptide bestehen aus vier bis fünf alternierend angeordneten D- und L-Aminosäuren inklusive meso-Diaminopimelinsäure, Ornithin oder Lanthionin und sind unter anderem häufig über die enzymatische Knüpfung einer Peptidbindung zwischen der freien Aminogruppe einer basischen Aminosäure, wie L-Lysin oder meso-Diaminopimelinsäure eines Muraminsäurepeptids, und der freien Carboxylgruppe einer terminalen Aminosäure, meist D-Alanin, eines anderen Muraminsäurepeptids durch eine Glycopeptidtranspeptidase verbunden (Schleifer und Kandler, 1972). Daneben kann die Quervernetzung der Peptidketten auch über ein Polyglycinbrückenpeptid stattfinden, wie z.B. bei *Staphylococcus aureus* (Navarre und Schneewind, 1999).

Der andere Hauptbestandteil der Zellwand grampositiver Bakterien setzt sich zusammen aus den kovalent an das PepG-Netz der Zellwand gebundenen Teichonsäuren und Teichuronsäuren, sowie zu einem geringeren Anteil aus Lipoteichonsäuren. LTA besteht aus hydrophilen Glycerophosphat-Einheiten verschiedener Länge mit Zucker-, Aminosäure- und Fettsäure-Substitutionen, die über Glycolipide hydrophob in der Zellmembran verankert sind und durch das PepG-Netz hindurch bis an die Oberfläche reichen (Fischer, 1988; Fischer et al., 1997).



= N-Acetylglucosamin,
 = N-Acetylmuraminsäure,
 ○ = Aminosäure

Abbildung 6: Position von Peptidoglycan und Lipoteichonsäure in der Zellwand grampositiver Bakterien, sowie Aufbau des Peptidoglycangerüsts.

Peptidoglycan bildet die Hauptzellwandkomponente grampositiver Bakterien, zusammengesetzt aus zwei linearen Polysaccharidketten, alternierend aus N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin zusammengesetzt, die durch Peptide aus vier bis fünf Aminosäuren querverbunden sind. Lipoteichonsäure ist über ein Glycolipid mit der Zellmembran verankert und reicht durch das Peptidoglycangerüst hindurch bis an die Zelloberfläche.

In der Literatur ist beschrieben, dass LTA und PepG die überschießende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF α, IL-1, IL-6 und IL-10, sowie die Aktivierung anderer inflammatorischer Mediatoren des zellulären Immunsystems (z.B. von Makrophagen) stimulieren, was schließlich zum Sepsissyndrom führt (Cleveland et al., 1996; Gupta et al., 1996; Hattor et al., 1997; Hauf et al., 1997; Hermann et al., 2002; Timmerman et al., 1993).

1.4.2 Lipoteichonsäure- und Peptidoglycan-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion und ihre Effektorsysteme

Bei der durch grampositive Zellwandbestandteile ausgelösten intrazellulären Signaltransduktion scheinen - ähnlich wie bei LPS - das LBP, der CD14-Rezeptor, die TLR-Familie sowie verschiedene MAPKs und die PKC beteiligt zu sein, die zur Freisetzung verschiedener Zytokine, darunter TNF α und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führen.

Die Zellaktivierung durch LTA ist nach Schröder et al. (2000, 2001), parallel zur zellulären Wirkung von LPS, abhängig von LBP. In Untersuchungen mit Makrophagen in Anwesenheit und Abwesenheit von LBP konnte durch Immunoblotting eine LBP-abhängige MAPK-Aktivierung durch LTA festgestellt werden.

Gupta et al. (1996) fanden heraus, dass anti-CD14 monoklonale Antikörper die Aktivierung von CD14-positiven Monozyten durch LPS und PepG hemmten, wodurch man zu der Vermutung gelangte, CD14 sei ein Rezeptor sowohl für LPS als auch für PepG. In der Folge wurde gezeigt, dass sowohl die Bindung von PepG (Cheon et al., 2008; Dziarski et al., 1998; Weidemann et al., 1997) als auch von LTA (Cleveland et al., 1996; Hattor et al., 1997; Hermann et al., 2002) an CD14 zur CD14-abhängigen Zellaktivierung führt.

Während TLR4 das gramnegative Endotoxin LPS erkennt, soll TLR2 die grampositiven Zellwandbestandteile PepG und LTA erkennen (Lien et al., 1996; Paik et al., 2006; Schwandner et al., 1999; Seo et al., 2008; Takeuchi et al., 1999, 2000; Underhill et al., 1999; Wang et al., 2001; Yoshimura et al., 1999). Darüber hinaus scheint TLR2 mit mindestens zwei weiteren TLRs zu kooperieren, TLR1 und TLR6 (Ozinsky et al., 2000; Takeuchi et al., 2000, Triantafyllou et al., 2006). In einigen Studien konnte auch eine Stimulation von Zellen durch LTA via TLR4 festgestellt werden (Schröder et al., 2000, 2001; Yang et al., 2001a). Neuere *in vivo* Untersuchungen bei Mäusen und Ratten deuten daraufhin, dass die LTA-induzierten Entzündungsreaktionen der Lunge hauptsächlich durch den Rezeptor TLR2 vermittelt

werden mit einer zusätzlichen, untergeordneten Beteiligung von TLR4 (Dessing et al., 2008; Knapp et al., 2008).

PepG wird außerdem über zytoplasmatische Proteine, die eine Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (NOD, nucleotide-binding oligomerisation domain) besitzen, erkannt. NOD2 bindet Muramyldipeptid (MDP, N-Acetylmuramyl-L-Alanin-D-Isoglutamin), das als bioaktiver, struktureller Bestandteil von PepG bekannt ist und im PepG grampositiver und gramnegativer Bakterien enthalten ist (Girardin et al., 2003b; Inohara et al., 2003). NOD1 erkennt meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP), eine ebenfalls bioaktive Komponente von PepG die hauptsächlich im PepG gramnegativer Bakterien zu finden ist (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003a). Es wird eine Kooperation von NOD und TLR vermutet (Takada und Uehara 2006).

Ein möglicher Signaltransduktionsweg von LTA in menschlichen Lungenepithelzellen soll nach Lin et al. (2001, 2002) die Aktivierung der PKC und nachfolgend der MAPK ERK1/2 und p38-MAPK einschließen, welche wiederum NF κ B aktivieren, was schließlich zur Cox-2-Expression und Freisetzung von PGE₂ führen soll. Auch Card et al. (1994) berichten über eine Freisetzung von PGE₂ durch LTA. Schröder et al. (2001) zeigten, dass LTA von *Treponema*-Spezies, ähnlich wie LPS, in der Lage ist, in isolierten Zellen die MAPK ERK1/2, JNK und p38-MAPK zu aktivieren. PepG dagegen aktiviert nach Dziarski et al. (1996) stark die ERK1/2, moderat die JNK, aber nur schwach die p38-MAPK.

Es konnte eine synergistische Wirkung von LTA und PepG bei der Freisetzung von Zytokinen, wie TNF α und Interferon- γ , zur Aktivierung der NO-Synthase und zur Auslösung von Schock und Multiorganversagen bei Ratten festgestellt werden (De Kimpe et al., 1995).

Kengatharan et al. (1998) vermuteten, dass MDP diejenige Komponente des PepG-Polymers darstellt, welche im Zusammenwirken mit LTA dafür verantwortlich ist Schock und Multiorganversagen bei Ratten auszulösen. Auch bei menschlichen Monozyten konnte ein synergistischer Effekt von MDP und LTA bei der Zytokininduktion nachgewiesen werden (Yang et al., 2001a).

1.4.3 Physiologisch messbare Reaktionen in der isolierten und blutfrei perfundierten Rattenlunge bei "grampositivem Priming"

Wie auch bei dem "Priming" durch gramnegative Bakterienwandbestandteile im Modell der isolierten Rattenlunge, wird in dieser Arbeit gezeigt, dass auch grampositive Bakterienwandbestandteile in intakten Lungen eine "Priming"-Reaktion auslösen können. Die durch Verabreichung diverser Inhibitoren bewirkten Veränderungen der registrierten Messwerte und analysierten Eikosanoidmengen im Perfusat geben Hinweise auf mögliche Signaltransduktionswege, über die LTA und PepG eine Stimulation in isolierten Lungen bewirken könnten. Im Gegensatz zum "LPS-Priming" ist hinsichtlich der Bedeutung des "grampositiven Primings" derzeit noch vieles unerforscht.

2. ZIELE DER ARBEIT

Die bakterielle Mischinfektion mit grampositiven und gramnegativen Bakterien kann eine überschießende inflammatorische Reaktion des Körpers auslösen, die häufig zu einem septischen Multiorganversagen und ARDS führt, mit oftmals letalem Ausgang. Vor diesem Hintergrund ist die Identifizierung der Wirkmechanismen bakterieller Pathogenitätsfaktoren in der Lunge, wie z.B. der Wandbestandteile grampositiver und gramnegativer Bakterien, von Bedeutung für die Entwicklung therapeutischer Interventionsstrategien mit Blockierung beteiligter pulmonaler Proteine der Signaltransduktion und der zellulären Effektorsysteme.

Die Ziele dieser Arbeit waren es, am anerkannten Modell der isolierten Rattenlunge insbesondere folgenden Fragestellungen nachzugehen:

1. Ist die Proteinkinase A an der intrazellulären Signaltransduktion des "gramnegativen Primings" durch den Bakterienwandbestandteil Lipopolysaccharid beteiligt?
2. Welche Rolle spielen die verschiedenen Proteinkinase C-Isoenzyme bei "gramnegativem Priming"?
3. Können die grampositiven Bakterienwandbestandteile Lipoteichonsäure und Peptidoglycan eine dem "Endotoxin-Priming" vergleichbare Reaktion auslösen?
4. Welche Bedeutung haben die verschiedenen PKC-Isoenzyme für die Signaltransduktionskaskade bei "Priming" durch Lipoteichonsäure und Peptidoglycan?
5. Sind die MAPK ERK1/2 und p38-MAPK ein Teil der intrazellulären Signalweiterleitung des "grampositiven Primings"?
6. Wird die Zyklooxygenase-2/Thromboxansynthase als Effektorsystem des "Primings" durch grampositive Zellwandbestandteile induziert?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden isoliert ventilierte und perfundierte Rattenlungen einer Stimulation durch grampositive oder gramnegative Bakterienwandbestandteile unterzogen und entsprechende spezifische Inhibitoren der oben genannten Enzyme eingesetzt. Die Reaktionen der Lungen auf die Stimulantien und Inhibitoren wurden durch permanente Messung des

Ventilationsdruckes, der Drücke von Pulmonalarterie und linkem Ventrikel, sowie des Lungengewichtes registriert und zusammen mit den durch ELISA-Technik gemessenen Konzentrationen der Arachidonsäuremetabolite Thromboxan B₂ (TXB₂), 6-keto-Prostaglandin F_{1α} (PGF_{1α}) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) in den Perfusatproben zur quantitativen Bestimmung der Freisetzung der jeweiligen Metabolite ausgewertet.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialliste

3.1.1 Chemikalien

Aqua ad injectabilia	Pharmacia, D-Erlangen
Arachidonsäure (AA)	Paesel und Lorei GmbH&Co, D-Frankfurt
Bisindolylmaleimid I	Calbiochem-Novabiochem GmbH, D-Schwalbach
DUP-697	DuPont Merck Pharmaceutical Co., USA-Wilmington
Elektrolytlösung I/3	I/3 Serag-Wiessner, D-Naila
ELISA-Kit 6-keto-Prostaglandin F _{1α}	R&D Systems Inc., USA-Minneapolis
ELISA-Kit Prostaglandin E ₂	R&D Systems Inc., USA-Minneapolis
ELISA-Kit Thromboxan B ₂	R&D Systems Inc., USA-Minneapolis
Gö 6976	Calbiochem-Novabiochem GmbH, D-Schwalbach
Gö 6983	Calbiochem-Novabiochem GmbH, D-Schwalbach
H-89	Calbiochem-Novabiochem GmbH, D-Schwalbach
Heparin-Natrium	Liquemin [®] , Hoffmann-La Roche, D-Grenzach- Wyhlen
Lidocainhydrochloridlösung	Xylocain [®] 2 %, Astra Zeneca GmbH, D-Wedel
Lipopolysaccharid (LPS)	LPS von <i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>Abortusequi</i> (S-Form), Cytogen, D-Bodenheim
Lipoteichonsäure (LTA)	LTA von <i>Staphylococcus aureus</i> , SIGMA- ALDRICH [®] , D-Deisenhofen
Myristoylierter PKCβ _{C2-4} - Inhibitor	Biomol, D-Hamburg
Natriumchloridlösung 0,9%	Pharmacia, D-Erlangen
Natriumhydrogencarbonat 8,4%	Serag-Wiessner, D-Naila
NS-398	Biomol, D-Hamburg
Pentobarbitalnatrium	Narcoren [®] , Merial, D-Halbergmoos
Peptidoglycan (PepG)	PepG von <i>Staphylococcus aureus</i> , FLUKA über SIGMA-ALDRICH [®] , D-Deisenhofen

Perfusat	1000 ml einer Elektrolytlösung 1/3 wurden mit 25 ml Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) 8.4 % versetzt. Die so erhaltene Perfusionslösung setzte sich zusammen aus 2,4 mmol Calciumchlorid-Dihydrat, 1.3 mmol Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 4.3 mmol Kaliumchlorid, 1.1 mmol Kaliumhydrogenphosphat, 125 mmol Natriumchlorid, 13.32 mmol Glucose und 25 mmol Natriumhydrogencarbonat.
Povidonjodlösung	Braunoderm [®] , B. Braun, D-Melsungen
Ro-31-8425	Calbiochem-Novabiochem GmbH, D-Schwalbach
Ro-32-0432	Biomol, D-Hamburg
SB-203580	Biomol, D-Hamburg
SC-236	Searle, USA-St. Louis
UO126	Calbiochem-Novabiochem GmbH, D-Schwalbach

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Beatmungsgerät für Kleintiere	Small Animal Ventilator KTR-4, Hugo Sachs Elektronik, D-March
Blutgasanalysator	ABL330, Radiometer, SWE-Kopenhagen
Blutdruckmonitor	Modell 23603702, Marquette Hellige, D-Neudrossenfeld
Dreikanalschreiber	Modell R-OX, Rikadenki Electronics GmbH, D-Freiburg
Druckaufnehmer	Combitrans Monitoring Set Med. II for arterial blood pressure measurement, B. Braun, D-Melsungen
Easy-Load-Pumpenkopf	Modell 7518-10, Cole Parmer Instrument Co., USA-Chicago
Farbtintenstrahldrucker	Deskjet 500, Hewlett-Packard, D-Böblingen
Glasgefäße	Glasbläserei Justus-Liebig-Universität, D-Gießen
Glasspirale	Glasbläserei Justus-Liebig-Universität, D-Gießen

Glaswärmekammer	Glasbläserei Justus-Liebig-Universität, D-Gießen
Heizgerät	Thermomix [®] , Modell 1442, B. Braun, D-Melsungen
Kühlgerät	Frigomix [®] , Modell 1495, B. Braun, D-Melsungen
Hoch-Temperatur-Polysulfon- Käfige	1500 U Eurostandard Typ IV S, Tecniplast, D-Hohenpeißenberg
Labortiereinstreu aus Hobelspänen	Abedd, Lab & Vet Service GmbH, A-Wien
Messverstärker	KWS 3073, Hottinger Baldwin Messtechnik, D-Darmstadt
Mikrotiterplattenlesegerät	Infinite M 200, Tecan Deutschland GmbH, D-Crailsheim
Nagetierfutter	Harlan Teclad 2018 Global Rodent Diet, Harlan Teklad, Shaw's Farm, GB-Blackthorn
Pulmonalkatheter aus Metall	Hugo Sachs Elektronik, D-March
Rollerpumpe	Masterflex [®] , Cole Parmer Instrument Co., USA-Chicago
Schlauchmaterial	Masterflex [®] , Cole Parmer Instrument Co., USA-Chicago
Trachealkanüle aus Metall	Hugo Sachs Elektronik, D-March
Ventrikelskatheter aus Metall	Hugo Sachs Elektronik, D-March
Wägezelle	Modell U1-G, Hottinger Baldwin Messtechnik, D-Darmstadt

3.2 Angaben zu den verwendeten Inhibitoren

3.2.1 Proteinkinase A (PKA)-Inhibitor

Der PKA-Inhibitor H-89 ist ein zellpermeabler, selektiver und potenter Inhibitor der PKA ($K_i = 48 \text{ nM}$). Andere Kinasen werden erst ab höheren Konzentrationen gehemmt ($K_i = 28.3\text{-}38.3 \text{ }\mu\text{M}$) (Chijiwa et al., 1990; Combest et al., 1988; Davies et al., 2000; de Rooij et al., 1998; Findik et al., 1995; Geilen et al., 1992; Kawasaki et al., 1998; Leemhuis et al., 2002).

3.2.2 Proteinkinase C (PKC)-Inhibitoren

Es kamen sechs verschiedene PKC-Inhibitoren zum Einsatz, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Gö 6976 hemmt selektiv die Ca^{2+} -abhängigen Isoenzyme $\text{PKC}\alpha$ und $\text{PKC}\beta_1$ ($\text{IC}_{50} = 2.3\text{-}6.2 \text{ nM}$), beeinflusst nicht die Kinaseaktivität der Ca^{2+} -unabhängigen $\text{PKC}\delta$ -, ϵ - und ζ -Isoenzyme, hemmt zusätzlich $\text{PKC}\mu$ in höherer Dosierung ($\text{IC}_{50} > 2.3 \text{ nM}$) (Gschwendt et al., 1996; Martiny-Baron et al., 1993; Qatsha et al., 1993; Wenzel-Seifert et al., 1994).

Der Myristoylierte $\text{PKC}\beta_{\text{C2-4}}$ -Inhibitor hemmt die Aktivierung der PKC-Isoenzyme mit C2-Domäne ($\text{IC}_{50} = 8\text{-}20 \mu\text{M}$), das heißt $\text{PKC}\alpha$, β_1 , β_{II} und γ , aber nicht $\text{PKC}\delta$ und ϵ (Eichholtz et al., 1993; Ron et al., 1995; Souroujon und Mochly-Rosen, 1998; Ward und O'Brian, 1993; Yedovitzky et al., 1997).

Ro-31-8425 ist ein potenter und selektiver Inhibitor der Proteinkinase C. Er zeigt Isoenzympezifität für PKC α , β_1 , β_{II} , γ und ϵ ($\text{IC}_{50} = 8\text{-}50 \text{ nM}$ für Rattenhirn-PKC). Er hat eine gering höhere Selektivität für die konventionellen Ca^{2+} -abhängigen Isoenzyme $\text{PKC}\alpha$, β und γ gegenüber dem Ca^{2+} -unabhängigen Isoenzym $\text{PKC}\epsilon$ (Merritt et al., 1997; Wilkinson et al., 1993).

Ro-32-0432 ist ein selektiver PKC-Inhibitor. Er zeigt eine zehnfach höhere Selektivität für $\text{PKC}\alpha$ und eine vierfach höhere Selektivität für $\text{PKC}\beta_1$ als für $\text{PKC}\epsilon$ (Radallah et al., 1999; Wilkinson et al., 1993). Es wurde nachgewiesen, dass eine Vorbehandlung mit $1\text{-}10 \mu\text{M}$ Ro-32-0432 verschiedene PKC-abhängige Aktivitäten in intakten Zellen blockiert (Laping et al., 1997; Wu und Nambi, 1998). Er ist auch *in vivo* aktiv (100 mg/kg intraperitoneal bei Ratten) (Bandla et al., 1999; Birchall et al., 1994).

Bisindolylmaleimid I (Gö 6850) ist ein hochselektiver zellpermeabler PKC-Inhibitor. Er wirkt als kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindungsseite von PKC. Er zeigt hohe Selektivität für die Isoenzyme $\text{PKC}\alpha$, β_1 , β_{II} , γ , δ , und ϵ ($K_i = 10 \text{ nM}$) und zusätzlich

wird in höheren Konzentrationen ($K_i > 2 \mu\text{M}$) die Proteinkinase A gehemmt (Gekeler et al., 1996; Kiss et al., 1995; Ku et al., 1997; Toullec et al., 1991).

Gö 6983 ist ein potenter Inhibitor der PKC, bei dem gezeigt wurde, dass er selektiv mehrere PKC-Isoenzyme hemmt, nämlich PKC α , β , γ , δ und ζ ($IC_{50} = 6-60 \text{ nM}$) und weniger effektiv auch die PKC μ ($IC_{50} = 20 \mu\text{M}$) (Gschwendt et al., 1996; Stempka et al., 1997; Wang et al., 1998).

Proteinkinase C-Inhibitoren	Proteinkinase C-Isoenzyme											
	Konventionelle Ca^{2+} -abhängige				Neue Ca^{2+} -unabhängige					Atypische Ca^{2+} -unabhängige		
	α	β_I	β_{II}	γ	δ	ϵ	η	μ	θ	ζ	ι	λ
Gö 6976	+	+			O	O		+		O		
Myristoylierter PKC β_{C2-4}	+	+	+	+	O	O						
Ro-31-8425	+	+	+	+		+						
Ro-32-0432	+	+				+						
Bisindolylmaleimid I	+	+	+	+	+	+						
Gö 6983	+	+	+	+	+			+		+		

+ Selektive Hemmung
O Keine Hemmung

Tabelle 1: Übersicht zur Selektivität der verwendeten PKC-Inhibitoren.

3.2.3 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Inhibitoren

Der ERK1/2-Inhibitor UO126 ist ein spezifischer Inhibitor der Mitogen aktivierten Proteinkinase Kinase (MEK)1 und 2. UO126 hemmt die Aktivierung der MAPK ERK1/2 durch Hemmung der MEK1/2-Aktivität (Duncia et al., 1998; Favata et al., 1998).

Der p38-MAPK-Inhibitor SB-203580 ist ein selektiver Inhibitor, der kompetitiv zu ATP diese Kinase hemmt (Cuenda et al., 1995; Young et al., 1997). Er hemmt die p38-MAPK-Stimulation der Mitogen aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase-2 (MAPKAPK2) ($IC_{50} = 70 \text{ nM}$) (Clerk und Sugden, 1998).

3.2.4 Zyklooxygenase (Cox)-2-Inhibitoren

Es wird eine selektive Hemmung der Cox-2 durch die eingesetzten Inhibitoren DUP-697 (Kargman et al., 1996; Seibert et al., 1996), SC-236 (Masferrer et al., 1999; Petersen et al., 2000) und NS-398 (Barnett et al., 1994; Futaki et al., 1994) erzielt.

3.3 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden männliche CD-Ratten (Sprague Dawley) der Firma Charles River (D-Sulzfeld) mit einem Gewicht von 350-400 g verwendet. Die Haltung der Tiere und alle experimentellen Verfahren wurden in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Es handelte sich um anzeigepflichtige Experimente, die beim Regierungspräsidium Gießen angezeigt und genehmigt worden waren. Die Ratten wurden in Gruppen von maximal fünf Tieren in Hoch-Temperatur-Polysulfon-Käfigen mit einer Nutzfläche von 1500 cm² auf Labortiereinstreu aus Hobelspänen gehalten. Die Raumtemperatur betrug 22-24 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 55-60 %. Die Hell-Dunkel-Periode lag bei jeweils 12 Stunden. Leitungswasser und Nagetierfutter standen *ad libidum* zur Verfügung.

3.4 Tierpräparation mit Lungenisolation, Ventilation und Perfusion

Nach tiefer Anästhesie der Ratten durch eine intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht Pentobarbitalnatrium wurden diese in Rückenlage auf dem Präparationstisch fixiert und das Präparationsgebiet mit Povidonjodlösung desinfiziert. Anschließend erfolgte eine Lokalanästhesie durch subcutane Injektion von 1.5 ml einer Lidocainhydrochloridlösung (Xylocain[®] 2 %) im ventralen cranialen Drittel des Halses der Versuchstiere. An dieser Stelle erfolgte eine mediane Inzision und Freipräparation der Trachea. Es wurde eine Tracheotomie durchgeführt und unmittelbar darauf eine Trachealkanüle mit 2.5 mm Durchmesser eingebunden, die sogleich mit einem Beatmungssystem verbunden wurde. Gleichzeitig mit der Intubation beginnend wurden die Ratten bis zum Ende des Versuches mit einem Beatmungsgerät für Kleintiere kontrolliert beatmet. Die Beatmungsluft bestand aus

mit CO₂ angereicherter Raumluft, final zusammengesetzt aus ca. 4 % CO₂, 17 % O₂ und 79 % N₂. Das Beatmungsvolumen betrug 4 ml, bei einer Beatmungsfrequenz von 65 Atemhüben/min. Es folgte eine Laparotomie in der Medianen mit Erweiterung nach lateral entlang der Rippenbögen und anschließender antikoagulativer Behandlung der Ratten durch Injektion von 1 000 I.E./kg Körpergewicht Heparin-Natrium in die *Arteria renalis sinistra*. Das Diaphragma wurde nach der Laparotomie von caudal, in der Nähe des *Xyphoides*, inzisiert und nach ventrolateral entlang der Rippenbögen abgetrennt. Ab diesem Zeitpunkt wurde über den gesamten Versuchsablauf mit einem konstanten, positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 3 cm Wassersäule beatmet, um einer Atelektasebildung entgegenzuwirken. Nach einer midsternalen Thorakotomie bis zur Intubationsinzision wurden Pericard und Thymus zur besseren Darstellung von *Aorta ascendens* und *Arteria pulmonalis* reseziert. Der rechte Ventrikel wurde cranial eröffnet und der an ein Schlauchsystem angeschlossene Pulmonalkatheter mit 2.5 mm Durchmesser in die *Arteria pulmonalis* eingebunden. Hierbei wurde gleichzeitig die *Aorta ascendens* ligiert und es folgte eine rasche Abtrennung der Herzspitze, um den pulmonal-venösen Abfluss weiterhin zu gewährleisten. Die pulsatile Perfusion mit Elektrolytlösung als Perfusionsmedium erfolgte bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 4 ml/min über eine Masterflex[®]-Rollerpumpe mit Easy-Load-Pumpenkopf. Die Lunge wurde vorsichtig von cranial nach caudal entlang der Wirbelsäule, unter Durchtrennung der Trachea cranial der Intubationsstelle, der *Vena cava*, der Aorta, des Ösophagus und anhängender Pleuraanteile herauspräpariert und in aufrechter Position über das Ventilations- und Perfusionsschlauchsystem an einer Wiegevorrichtung aufgehängt. Über die eröffnete Herzspitze wurde anschließend ein Ventrikelkatheter mit 2.5 mm Durchmesser für den Abfluss von Perfusatflüssigkeit über den linken Ventrikel in das Atrium vorgeschoben und in den linken Ventrikel eingebunden. Das Ende des Katheters wurde mit dem Schlauchsystem verbunden, über welches das Perfusat, nach Zirkulation durch Herz und Lungengefäße, wieder abfließen konnte. Die Lunge wurde sodann von einer feuchten Wärmekammer umgeben. Die Wärmekammer bestand aus einer mit feuchten Tüchern ausgelegten und von Perfusatflüssigkeit durchströmten, doppelwandigen Glaskammer, die mit einer Plastikabdeckung verschlossen war. Die Durchflussgeschwindigkeit des Perfusates durch das explantierte Herz-Lungen-Präparat im offenen Zirkulationssystem wurde nach der Präparation kontinuierlich von 4 ml/min auf 13 ml/min gesteigert. Zeitgleich erfolgte

eine Anhebung der Perfusatemperatur von 4 °C auf 37 °C. Entsprechend herrschte final eine Temperatur von 37 °C in der Wärmekammer. Nach ca. 20 min dieser andauernden Durchspülung des Lungengefäßbettes mit kontinuierlich erneuerter Perfusionsflüssigkeit zur Auswaschung von Blutbestandteilen wurde der Perfusionskreislauf geschlossen und die rezirkulierende Perfusion begann. Um vorhandene atelektatische Bereiche in der Lunge zu eröffnen, wurde die Lunge zu Beginn der 30-minütigen Vorlaufphase durch manuellen Verschluss des Schlauches, welcher die Ausatemungsluft abführt, zweimal für jeweils zwei durch das Beatmungsgerät zugeführte Atemhübe gebläht. Im weiteren Verlauf der Versuche wurde die Lunge nach jeweils 30 min durch jeweils einmaligen Verschluss des Schlauches für zwei zugeführte Atemhübe gebläht.

3.5 Extrakorporales Zirkulationssystem

Das für die Perfusion verwendete extrakorporale Zirkulationssystem (Abb. 7) bestand aus zwei doppelwandigen Glasgefäßen mit jeweils 150 ml Fassungsvermögen, einer doppelwandigen Glasspirale und einer doppelwandigen Glaswärmekammer, die untereinander verbunden waren und über eine Einheit aus einem Kühlgerät und Heizgerät kontinuierlich mit Temperierflüssigkeit durchströmt wurden. Dieses ermöglichte die Temperaturkontrolle der Perfusionsflüssigkeit und der Wärmekammer, in der sich die Lunge befand. Das Vorhandensein zweier Glasgefäße ermöglichte den Wechsel zwischen zwei unabhängig voneinander bestehenden Zirkulationssystemen und somit den wiederholten Wechsel von Perfusionsflüssigkeit ohne Unterbrechung des Kreislaufes. Beide Gefäße waren mit einem Schlauchsystem bestehend aus Masterflex-Pumpenschläuchen mit Innendurchmessern von: 1.6 mm, 3.1 mm, 4.8 mm und 6.4 mm sowie Silikonschläuchen mit Innendurchmessern von: 3 mm beziehungsweise 4 mm verbunden, welches die Perfusatflüssigkeit aus dem Glasbehälter, durch eine Pumpe angetrieben, nach Passage der Glasspirale und einer zur Vermeidung von arteriellen Embolien präpulmonal interponierten Blasenfalle, über den Pulmonalkatheter der *Arteria pulmonalis* zuführte. Nach Passage der Lungenstrombahn gelangte das Perfusat in den linken Ventrikel und über den linksventrikulären Katheter und das Schlauchsystem zurück zum Glasgefäß. Bei dieser Zirkulation befanden sich immer

70 ml Perfusat im Glasgefäß und 30 ml im Schlauchsystem. Aufgrund der Verwendung sterilisierter Schlauch- und Glasbestandteile sowie Endotoxin-freier Perfusatlösung war eine Endotoxinkontamination des Perfusionssystems ausgeschlossen.

3.6 Kontrolle von pH-Wert und Beatmungsluft

Die Beatmung erfolgte mit unbefeuchteter Raumluft, mit der Möglichkeit über CO₂-Insufflation zur Beatmungsluft den pH-Wert des Perfusionsmediums konstant bei 7.35 bis 7.4 zu halten. Eine Kontrolle des pH-Wertes erfolgte regelmäßig durch Abnahme von Perfusatproben und deren Messung mit einem Blutgasanalysator. Die angestrebten Gasdrücke der Beatmungsluft lagen bei einem pO₂ von 150 mmHg und einem pCO₂ von 20-35 mmHg.

3.7 Perfusionsdruck-, Beatmungsdruck- und Gewichtsmonitoring

Das Gewicht (W) der Organpräparation wurde fortlaufend mit Hilfe einer elektronischen Wägezelle (Messbereich 0-500 g, Messgenauigkeit ±0.01 g) mit Messverstärker registriert und über einen Dreikanalschreiber aufgezeichnet (Abb. 7). Zu Beginn eines jeden Versuches wurde eine Eichung durchgeführt.

Zur kontinuierlichen Bestimmung des Ventilationsdruckes (VP), des pulmonalen arteriellen Druckes (PAP) und des linksventrikulären Druckes (LVP), befanden sich luftblasenfreie Polyethylen-Innenkatheter mit 0.5 mm Durchmesser in dem mit Perfusatflüssigkeit gefüllten Schlauchsystem (Abb. 7). Die Katheter wurden in der Nähe der Messstellen, das heißt vor Tracheal-, Pulmonalis- und Ventrikel-Kanüle platziert und an Druckaufnehmer angeschlossen, die mit einem Blutdruckmonitor zur kontinuierlichen Registrierung verbunden waren. Vor Versuchsbeginn wurde der Druck gegen den atmosphärischen Druck auf 0 mmHg geeicht, wobei der Nullpunkt der Druckaufnehmer auf Höhe des Lungenhilus eingestellt wurde. Der linksventrikuläre Druck wurde auf 2 mmHg gesetzt, um Zone-III-Bedingungen bei der Endexpirationsphase in allen Lungenbereichen zu garantieren, das heißt, um zu

gewährleisten, dass alle Lungenkapillaren geöffnet und alle Areale der Lunge perfundiert sind.

Alle genannten Parameter wurden kontinuierlich online registriert und abgespeichert (Abb. 7).

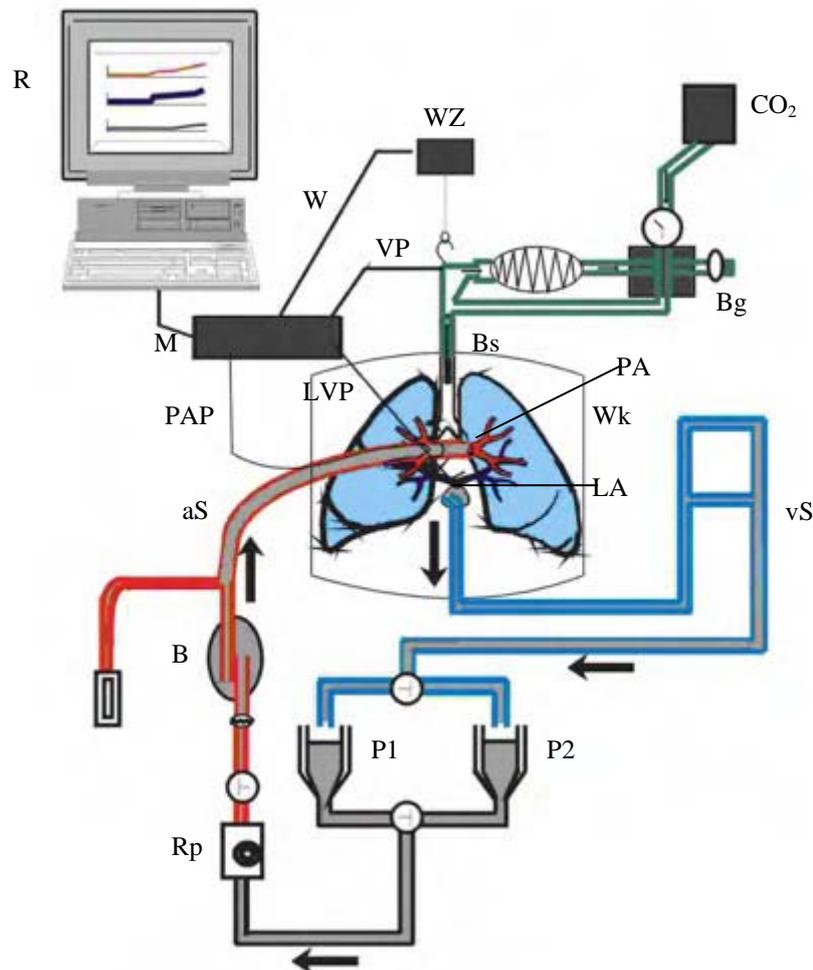


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der isoliert ventilerten und blutfrei perfundierten Rattenlunge.

aS arterielles Schlauchsystem; **B** Blasenfalle; **Bg** Beatmungsgerät; **Bs** Beatmungsschlauch; **CO₂** angeschlossene Gasflasche zur CO₂-Zufuhr; **LA** linkes Atrium; **LVP** Linksventrikulärer Druck; **M** Messverstärker; **P1,P2** Perfusatgefäße; **PA** Pulmonalarterie; **PAP** Pulmonaler arterieller Druck; **R** Registrierung und Speicherung der Messdaten; **Rp** Rollerpumpe; **VP** Ventilationsdruck; **vS** venöses Schlauchsystem; **W** Gewicht; **Wk** Wärmekammer; **WZ** Wägezelle.

Die Pfeile zeigen die Richtung des Perfusatflusses an.

Es wurden nur solche Lungen für die Studie ausgewählt, die den folgenden Anforderungen entsprachen:

1. Die sichtbaren, subpleural gelegenen Parenchymanteile waren homogen weiß, ohne Anzeichen von Ödembildung oder von hämorrhagischen beziehungsweise nicht perfundierten Kapillarbezirken.
2. Der pulmonale arterielle Druck lag im Bereich von 5-7 mmHg und der Ventilationsdruck im Bereich von 4-5 mmHg.
3. Das Gewicht hat sich über die 30-minütige Vorlaufphase nicht verändert.

3.8 Versuchprotokoll

Alle Versuche wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die folgenden Protokollpunkte gelten für alle durchgeführten Versuche:

1. Die kontinuierliche Datenaufzeichnung von W, VP, PAP und LVP begann bei jedem Versuch zum Zeitpunkt -30 min mit der 30-minütigen Vorlaufphase (Abb. 8).
2. Die erste Perfusatprobenentnahme aus dem extrakorporalen Zirkulationssystem erfolgte vor der Verabreichung des als Stimulus verwendeten Bakterienwandbestandteiles, das heißt je nach Versuchsprotokoll zum Zeitpunkt -5 min oder 0 min. Die nächsten Proben wurden zum Zeitpunkt 120 min und 125 min aus der Perfusatsflüssigkeit genommen. Es wurden jeweils Proben von 1 ml Volumen zur Perfusatanalyse und pH-Wertkontrolle entnommen (Abb. 8). Für eine spätere Perfusatanalyse mittels ELISA-Technik wurden die Proben sofort nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff (-196 °C) verbracht und anschließend bei -20 °C gelagert.
3. Zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min wurden die Lungen jeweils einmalig, zum Zeitpunkt -30 min zweimalig, für zwei Atemhübe durch manuellen Verschluss des Schlauches gebläht, welcher die Ausatemungsluft abführt, um eventuell entstandene atelektatische Bereiche wieder zu öffnen (Abb. 8).
4. Zum Zeitpunkt 120 min wurde dem Perfusat freie Arachidonsäure in einer Konzentration von 10 µmol/l als Stimulus zugesetzt (Abb. 8).

5. Beendet wurden die Aufzeichnungen zum Zeitpunkt 130 min (Abb. 8).

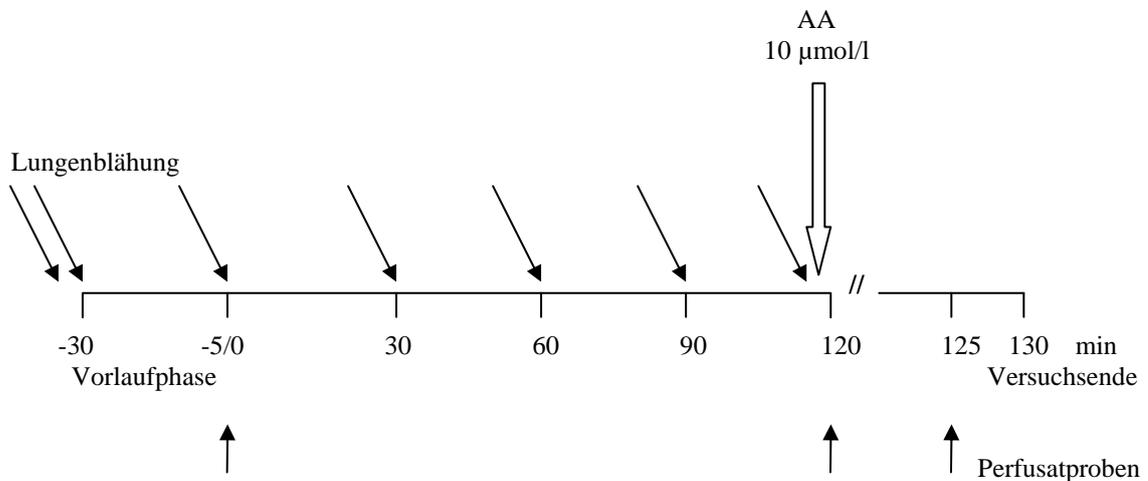


Abbildung 8: Zeitplan zum allgemeinen Ablauf aller Versuche mit isoliert perfundierten Rattenlungen.

Die Datenaufzeichnung begann mit einer 30-minütigen Vorlaufphase und endete nach 130 min. Die Lungen wurden zu den Zeitpunkten -30, 0, 30, 60, 90 und 120 min gebläht. Es wurden Perfusatproben zu den Zeitpunkten -5 (bei Versuchen mit Inhibitor) oder 0 (bei Versuchen ohne Inhibitor) sowie 120 und 125 min entnommen. Nach 120 min wurde AA (10 µmol/l) dem Perfusat zugefügt.

3.8.1 Kontrollversuche

Bei den Kontrollversuchen ($n = 5$) wurden die Lungen nach der 30-minütigen Vorlaufphase für zwei Stunden rezirkulierend perfundiert und zum Zeitpunkt 120 min wurde Arachidonsäure in einer Endkonzentration von 10 µmol/l im Perfusat der Perfusionsflüssigkeit zugefügt, um als Stimulans zu wirken (Abb. 8).

3.8.2 "Priming"-Versuche

3.8.2.1 Untersuchungen zum "gramnegativen Priming"

Bei den "gramnegativen Priming"-Versuchen ($n = 5$) ohne Inhibitorzugabe wurde der Perfusionsflüssigkeit nach Beendigung der Vorlaufphase, zum Zeitpunkt 0 min, LPS in einer Endkonzentration im Perfusat von 10 µg/ml beigegeben und die Rattenlunge somit durch das im rezirkulierenden Perfusat bis zum Versuchsende vorhandene

LPS stimuliert. Zum Zeitpunkt 120 min erfolgte die Beifügung von Arachidonsäure zur Perfusionsflüssigkeit in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ im Perfusat (Abb. 10).

3.8.2.2 Untersuchungen zum “gramnegativen Priming“ mit Einsatz von verschiedenen Proteinkinase (PK)-Inhibitoren

Bei den Versuchen mit verschiedenen PK-Inhibitoren wurde die Rattenlunge ab dem Zeitpunkt -5 min durch Zugabe von LPS in einer Endkonzentration im Perfusat von 10 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert und Arachidonsäure wurde zum Zeitpunkt 120 min in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ im Perfusat der Perfusionsflüssigkeit beigefügt (Abb. 9).

Der Zeitpunkt der Verabreichung und die Konzentration der PK-Inhibitoren wurden nach Durchführung von Testversuchen und in Anlehnung an die in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen verwendeten Dosierungen festgelegt (Bandla et al., 1999; Birchall et al., 1994; Chijiwa et al., 1990; Combest et al., 1988; Davies et al., 2000; de Rooij et al., 1998; Eichholtz et al., 1993; Félétou et al., 2001; Findik et al., 1995; Geilen et al., 1992; Gekeler et al., 1996; Ghosh et al., 2001; Gschwendt et al., 1996; Kanke et al., 2001; Kawasaki et al., 1998; Keffel et al., 1999; Kiss et al., 1995; Ku et al., 1997; Laping et al., 1997; Martiny-Baron et al., 1993; Merritt et al., 1997; Qatsha et al., 1993; Radallah et al., 1999; Rogalski et al., 2000; Ron et al., 1995; Sauvage et al., 2000; Souroujon und Mochly-Rosen, 1998; Stempka et al., 1997; Togashi et al., 1998; Toullec et al., 1991; Wang et al., 1998; Ward und O'Brian, 1993; Wenzel-Seifert et al., 1994; Wilkinson et al., 1993; Wu und Nambi, 1998; Yang et al., 2001b; Yedovitzky et al., 1997; Zheng et al., 2000).

Zum Zeitpunkt 0 min wurden die PK-Inhibitoren zusätzlich zu LPS dem bis zum Versuchsende rezirkulierenden Perfusat zugefügt (Abb. 9). Alle Inhibitoren wurden in den nachfolgend angegebenen Endkonzentrationen im Perfusat eingesetzt, die über den IC_{50} -Werten (Dosis der 50%igen Inhibitionskapazität) für die Hemmung der entsprechenden PK-Isoenzyme lagen. Der Inhibitor Bisindolylmaleimid I wurde in einer Konzentration von 50 nM ($n = 5$) dem Perfusat zugesetzt. Gö 6983 kam mit

20 μM ($n = 5$) und Gö 6976 mit 50 nM ($n = 5$) Endkonzentration zum Einsatz. Der Myristoylierter $\text{PKC}\beta_{\text{C2-4}}$ -Inhibitor wurde in einer Konzentration von 10 μM ($n = 5$) dem Perfusat beigegeben. Ro-31-8425 wurde in einer Konzentration von 50 nM ($n = 5$) und Ro-32-0432 in einer Konzentration von 10 μM ($n = 5$) angewendet.

Der PKA-Inhibitor H-89 wurde dem Perfusat in einer Perfusatendkonzentration von 100 nM zugefügt. Er wurde zum Zeitpunkt 0 min ($n = 5$) sowie in parallel durchgeführten Versuchen zum Zeitpunkt 60 min ($n = 5$) verabreicht (Abb. 9).

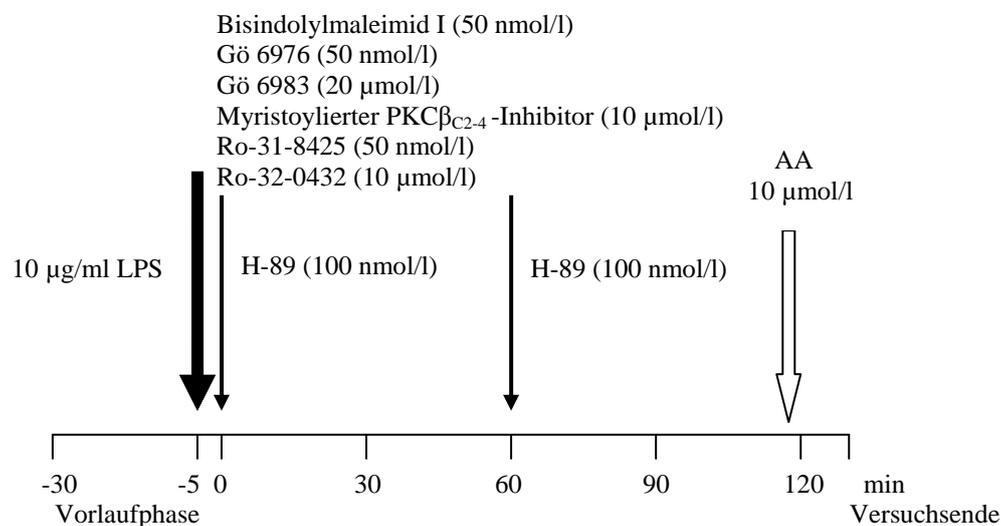


Abbildung 9: Zeitplan zum Ablauf der Inhibitionsversuche mit "gramnegativem Priming".

Die isoliert perfundierten Rattenlungen wurden ab dem Zeitpunkt -5 min durch die Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS zum Perfusat stimuliert und nach 120 min wurde AA (10 $\mu\text{mol/l}$) dem Perfusat zugefügt. Die Verabreichung der PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I (50 nmol/l), Gö 6976 (50 nmol/l), Gö 6983 (20 $\mu\text{mol/l}$), Myristoylierter $\text{PKC}\beta_{\text{C2-4}}$ -Inhibitor (10 $\mu\text{mol/l}$), Ro-31-8425 (50 nmol/l) oder Ro-32-0432 (10 $\mu\text{mol/l}$) erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0 min. Der PKA-Inhibitor H-89 wurde entweder zum Zeitpunkt 0 min oder 60 min dem Perfusat zugesetzt.

3.8.2.3 Untersuchungen zum "grampositiven Priming"

Die "grampositiven Priming"-Versuche lassen sich durch Unterschiede in Art und Menge des zum Zeitpunkt 0 min verabreichten Bakterienwandbestandteiles in sechs Untergruppen unterteilen (Abb. 10). Zum einen erfolgte eine alleinige Gabe von LTA und PepG. Dabei wurde LTA mit einer Endkonzentration im rezirkulierenden Perfusat von 10 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 5$) und 20 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 5$) angewendet. PepG wurde bei alleiniger

Gabe in den Konzentrationen 20 µg/ml (n = 5) und 50 µg/ml (n = 5) eingesetzt. Zum anderen wurde eine kombinierte Gabe von LTA und PepG in den Konzentrationen von jeweils 10 µg/ml (n = 5) und jeweils 20 µg/ml (n = 5) durchgeführt. Bei allen Versuchsgruppen wurde Arachidonsäure in einer Endkonzentration von 10 µmol/l im Perfusat zum Zeitpunkt 120 min der Perfusionsflüssigkeit hinzugegeben (Abb. 10).

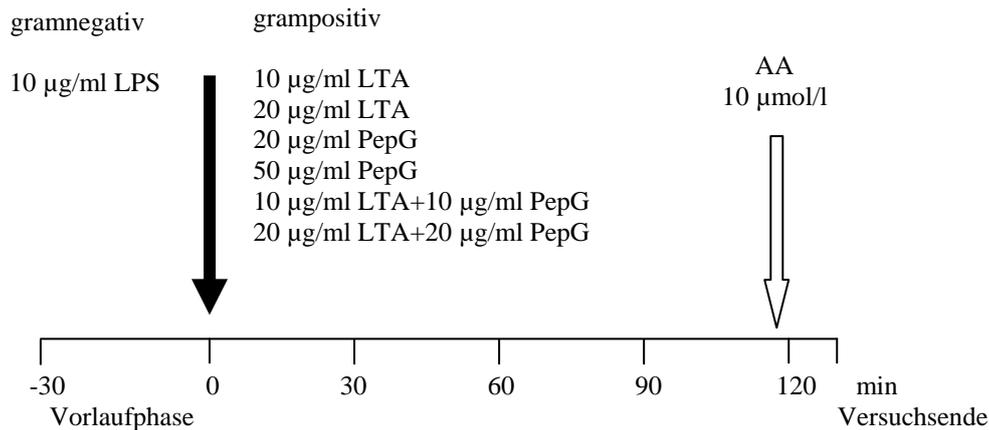


Abbildung 10: Zeitplan zum Ablauf der Versuche mit "gramnegativem oder grampositivem Priming".

Die isoliert perfundierten Rattenlungen wurden ab dem Zeitpunkt 0 min entweder durch die Zugabe von 10 µg/ml LPS oder von 10 bzw. 20 µg/ml LTA, 20 bzw. 50 µg/ml PepG, sowie 10 µg/ml LTA zusammen mit 10 µg/ml PepG bzw. 20 µg/ml LTA zusammen mit 20 µg/ml zum Perfusat stimuliert und nach 120 min wurde AA (10 µmol/l) dem Perfusat zugefügt.

3.8.2.4 Untersuchungen zum "grampositiven Priming" mit Einsatz von verschiedenen Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion sowie Zyklusoxigenase (Cox)-2-Inhibitoren

Bei den Versuchen zum "grampositiven Priming" unter Verwendung verschiedener Inhibitoren wurde die Lunge zum Zeitpunkt -5 min durch Zugabe von LTA zusammen mit PepG zur rezirkulierenden Perfusionsflüssigkeit in einer Endkonzentration im Perfusat von jeweils 20 µg/ml stimuliert (Abb. 11). Die Verwendung einer Kombination von LTA mit PepG in entsprechender Dosis wurde durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten und den Inhibitionsversuchen vorangegangenen Untersuchungen zum "grampositiven Priming" ermittelt. Der Perfusionsflüssigkeit wurde zum Zeitpunkt 120 min Arachidonsäure in einer Endkonzentration von 10 µmol/l im Perfusat zugefügt (Abb. 11). Die Verabreichung der Inhibitoren in den

jeweiligen Versuchsgruppen erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten in unterschiedlichen nachfolgend beschriebenen Endkonzentrationen im Perfusat.

Der jeweilige Zeitpunkt des Inhibitoreinsatzes und die Konzentration des Inhibitors wurden bei den Versuchen mit PKC-Inhibitoren in Anlehnung an die in dieser Arbeit durchgeführten, vorangegangenen Versuche mit diesen Inhibitoren bei "gramnegativem Priming" durch LPS gewählt. Zum Zeitpunkt 0 min wurde das Perfusat mit den PKC-Inhibitoren versehen (Abb. 11). Die PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I (n = 5) und Gö 6976 (n = 5) wurden in einer Endkonzentration im Perfusat von jeweils 50 nM, der Inhibitor Gö 6983 in einer Konzentration von 20 µM (n = 5) eingesetzt. Die Inhibitorkonzentrationen lagen somit über den IC₅₀-Werten für die Hemmung der entsprechenden PKC-Isoenzyme.

Bei den MAPK-Inhibitoren richteten sich Konzentration und Zeitpunkt der Verabreichung nach Testreihen und Angaben aus der Literatur (Börsch-Haubold et al., 1998; Clerk und Sugden, 1998; Cuenda et al., 1995; DeSilva et al., 1998; Duncia et al., 1998; Favata et al., 1998; Young et al., 1997). Der ERK1/2-Inhibitor UO126 wurde zum Zeitpunkt 60 min in einer Endkonzentration von 20 µM (n = 5) in das Perfusat gegeben (Abb. 11). Zum Zeitpunkt 60 min erfolgte die Beifügung des p38-MAPK-Inhibitors SB-203580 in einer Konzentration von 10 µM (n = 5) zum Perfusat (Abb. 11).

Bei den Cox-2-Hemmstoffen wurde, zur besseren Vergleichbarkeit der Daten, Dosis und Zeitpunkt der Gabe wie in den Vorstudien mit "gramnegativem Priming" (Ermert et al., 2000c) gewählt. Zum Zeitpunkt 110 min wurde der jeweilige Cox-2-Inhibitor verabreicht. NS-398 (n = 5) und DUP-697 (n = 5) wurden in einer Endkonzentration im Perfusat von 25 µM, SC-236 (n = 5) in einer Konzentration von 10 µM verwendet (Abb. 11).

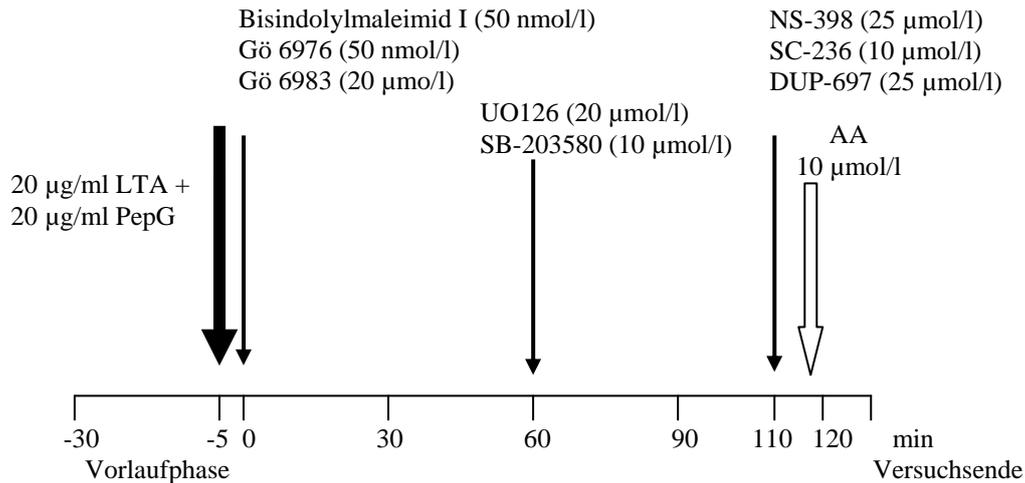


Abbildung 11: Zeitplan zum Versuchsablauf der Inhibitionsversuche mit "grampositivem Priming".

Die isoliert perfundierten Rattenlungen wurden ab dem Zeitpunkt -5 min durch die Zugabe von 20 µg/ml LTA zusammen mit 20 µg/ml PepG zum Perfusat stimuliert und nach 120 min wurde AA (10 µmol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Verabreichung der PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I (50 nmol/l), Gö 6976 (50 nmol/l) oder Gö 6983 (20 µmol/l) zum Perfusat erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0 min, des ERK1/2-Inhibitors UO126 oder des p38-MAPK-Inhibitors SB-203580 zum Zeitpunkt 60 min und der Cox-2-Inhibitoren NS-398 (25 µmol/l), SC-236 (10 µmol/l) oder DUP-697 (25 µmol/l) zum Zeitpunkt 120 min.

3.9 Perfusatprobenanalyse durch Bestimmung von Thromboxan B₂, 6-keto-Prostaglandin F_{1α} und Prostaglandin E₂

Der Arachidonsäuremetabolit Thromboxan A₂ (TXA₂) hat unter physiologischen Bedingungen eine Halbwertszeit von 37 sec (Smith, 1989), daher wird die Produktion von TXA₂ *in vivo* typischerweise durch die Messung seines stabilen Hydrolyseproduktes Thromboxan B₂ (TXB₂) überprüft (Mitchell et al., 1978; Viinikka und Ylikorkala, 1980).

Da der Arachidonsäuremetabolit Prostazyklin (PGI₂) eine Halbwertszeit von 60 min in Plasma und nur 2-3 min in Pufferlösung hat, wird die Produktion von PGI₂ typischerweise durch die Messung seines stabilen Hydrolyseproduktes 6-keto-Prostaglandin F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) überprüft (Ylikorkala und Mäkilä, 1985).

Zur quantitativen Bestimmung der in der Rattenlunge während der Versuche gebildeten und in den während der Versuche entnommenen Perfusatproben enthaltenen Arachidonsäuremetabolite, wurden TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} und

Prostaglandin E₂ (PGE₂) durch kompetitive Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) gemessen.

Das Prinzip der verwendeten Assays basiert auf der kompetitiven Bindungstechnik, wobei das in der Probe vorhandene TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} oder PGE₂ mit einer nach Herstellerangaben festgelegten Menge von mit alkalischer Phosphatase markiertem TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} oder PGE₂ um die Bindungsstellen an einem Antikörper konkurriert. Während der Inkubationszeit wird dieser Antikörper an die Mikroplatte gebunden, die mit einem Anti-Antikörper bedeckt ist. Im Anschluss an das Auswaschen von überschüssigem Konjugat und ungebundener Probe wird p-Nitrophenylphosphat (pNPP) in gepufferter Lösung als chromogenes Substrat in die Mikroplattenlöcher gegeben und von der alkalischen Phosphatase durch Abspaltung eines Phosphatrestes vom farblosen Nitrophenylphosphat in p-Nitrophenol umgewandelt, welches eine gelbliche Farbe hat. Die optische Dichte wird bei 405 nm Wellenlänge in einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Je höher die Konzentration von TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} oder PGE₂ in der Probe ist, desto weniger markiertes TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} oder PGE₂ bindet demzufolge an den Antikörper und wird über den Anti-Antikörper an die Mikroplatte gebunden. Die Intensität der Enzymreaktion und damit der Farbentwicklung ist dementsprechend umgekehrt proportional zur Konzentration von TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} oder PGE₂ in der jeweiligen Probe. Anhand einer Standardkurve wird die TXB₂-, 6-keto-PGF_{1α}- oder PGE₂-Konzentration ermittelt.

Die Probenvorbereitung und Messungen der unterschiedlichen ELISA wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.10 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der registrierten Versuchsdaten und der aus den Perfusatproben ermittelten Mengen an Arachidonsäuremetaboliten erfolgte mit dem Statistikprogramm Graph Pad Prism 2.01 (Graph Pad Software Inc., USA-San Diego).

Der Student's t-test für unverbundene Daten wurde bei allen Versuchen eingesetzt, um die Varianzen innerhalb und zwischen verschiedenen Versuchsgruppen zu vergleichen.

Alle in Text, Tabelle und Graphik verwendeten Daten sind berechnete Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Der Stichprobenumfang n bezeichnet die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Versuche innerhalb einer Gruppe.

Verwendete Bezeichnungen und Zusammenfassungen für die p-Werte:

p-Wert	Bezeichnung	Zusammenfassung
> 0.05	nicht signifikant	
< 0.05	signifikant	*
< 0.01	sehr signifikant	**
< 0.001	hochsignifikant	***

4. ERGEBNISSE

4.1 Kontrollversuche

Bei den Lungen der Kontrollversuche konnte während der gesamten zweistündigen, rezirkulierenden Perfusion keine nennenswerte Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes (Δ PAP), Ventilationsdruckes (Δ VP) oder Lungengewichtes (Δ W) festgestellt werden (Tab. 2a Anhang). Die Gabe von 10 μ mol/l freier AA in Abwesenheit eines vorangehenden bakteriellen Stimulus als "Priming" induzierte in den im Folgenden als Kontrolllungen bezeichneten Lungen signifikante Veränderungen. Es ergab sich ein geringer Anstieg des Δ PAP um 3.88 ± 0.15 mmHg innerhalb von 5 min (Abb. 12A, Tab. 2a Anhang). Parallel dazu kam es zu einer geringen Erhöhung des Δ W, während der Δ VP als Antwort auf die AA-Gabe fast unverändert blieb (Abb. 12B-C, Tab. 2a Anhang).

Perfusatanalyse: Nach 120 min rezirkulierender Perfusion der unstimulierten Lungen waren mit durchschnittlich 60.4 ± 21.9 pg/ml TXB₂, 234.0 ± 71.2 pg/ml PGE₂ und 1910.0 ± 111.8 pg/ml 6-keto-PGF_{1 α} nur sehr geringe Mengen an AA-Metaboliten in dem Perfusat messbar (Tab. 2c Anhang).

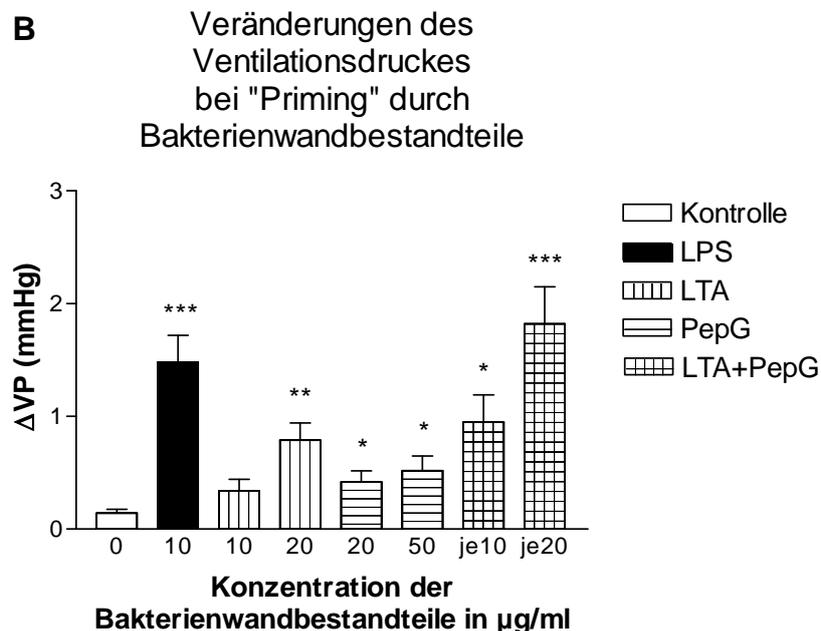
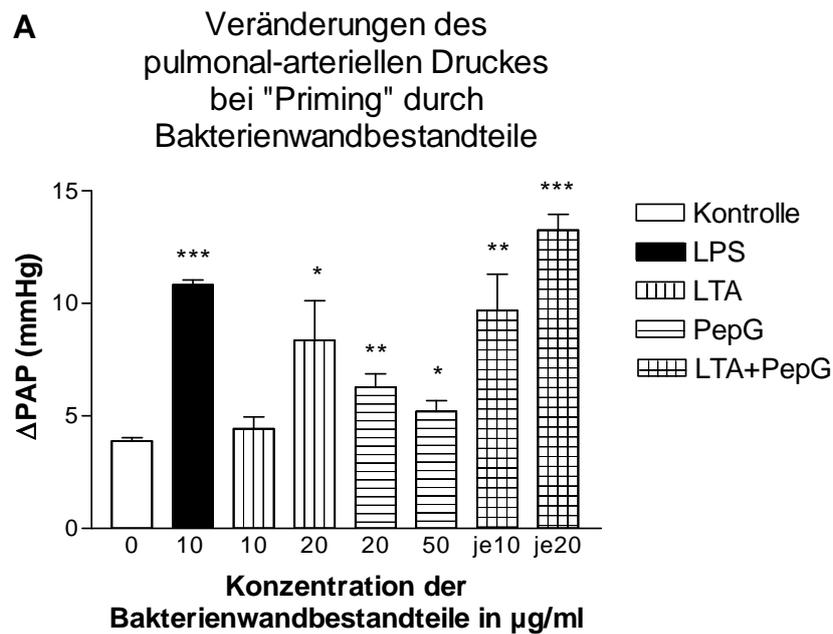
Nach der AA-Verabreichung kam es zu einem deutlichen Anstieg der Metabolite (Abb. 13A-C, Tab. 2e Anhang). Der TXB₂-Gehalt stieg innerhalb von 5 min nach AA-Gabe auf 2220.0 ± 543.1 pg/ml, die im Perfusat vorhandene Menge an PGE₂ und 6-keto-PGF_{1 α} erreichte Werte von 871.0 ± 209.8 und 22020.0 ± 6154.0 pg/ml.

4.2 "Priming"-Versuche

4.2.1 Untersuchungen zum "gramnegativen Priming"

Die Δ PAP- (Tab. 2b Anhang), Δ VP- und Δ W-Werte lagen während der zweistündigen rezirkulierenden Perfusion mit 10 μ g/ml LPS innerhalb des Normbereichs. Bei der nachfolgenden Applikation von AA war im Vergleich zu den unstimulierten Kontrolllungen nach AA-Gabe eine deutlich gesteigerte, signifikante Reaktion von

Δ PAP, Δ VP und Δ W zu verzeichnen (Abb. 12A-C, Tab. 2d Anhang). Der Δ PAP war mit 10.82 ± 0.22 mmHg beinahe dreimal so groß wie bei den Kontrollungen 5 min nach AA-Verabreichung, und auch die Δ VP-Zunahme von 1.48 ± 0.24 mmHg und der Δ W-Anstieg von 4.78 ± 1.07 waren knapp elf- und siebenmal höher als bei den Kontrollungen. Dies zeigt sehr deutlich die verstärkte Reaktion der Lungen auf freie AA bei vorheriger Verabreichung von LPS.



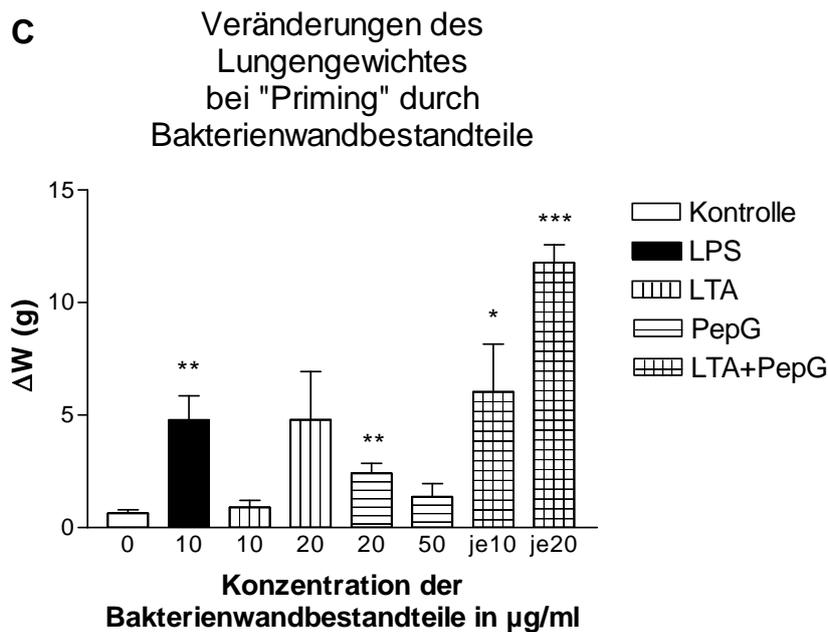


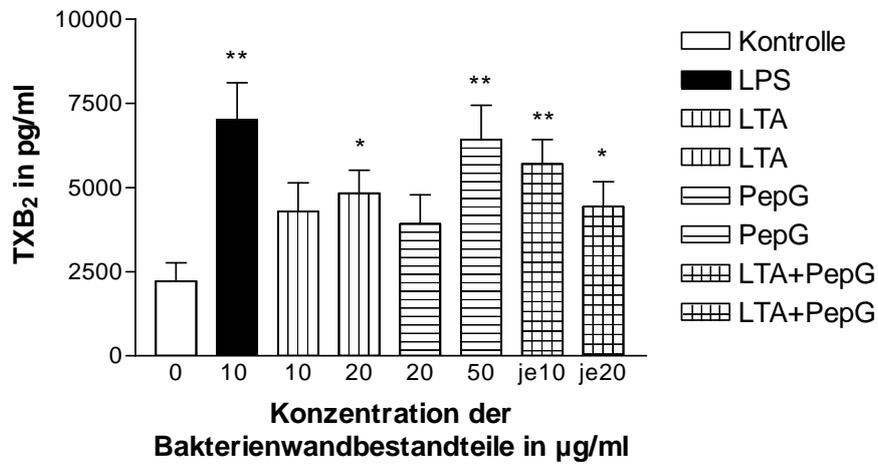
Abbildung 12A,B,C: Einfluss des "Primings" durch Bakterienwandbestandteile auf den Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (ΔPAP), Ventilationsdruckes (ΔVP) und Lungengewichtes (ΔW) nach AA-Applikation.

Die Lungen wurden ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle und in Anwesenheit von 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 10 und 20 $\mu\text{g/ml}$ LTA, 20 und 50 $\mu\text{g/ml}$ PepG, sowie 10 $\mu\text{g/ml}$ LTA zusammen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ PepG und 20 $\mu\text{g/ml}$ LTA zusammen mit 20 $\mu\text{g/ml}$ PepG perfundiert. Nach 2 h wurde AA (10 $\mu\text{mol/l}$) dem Perfusat zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

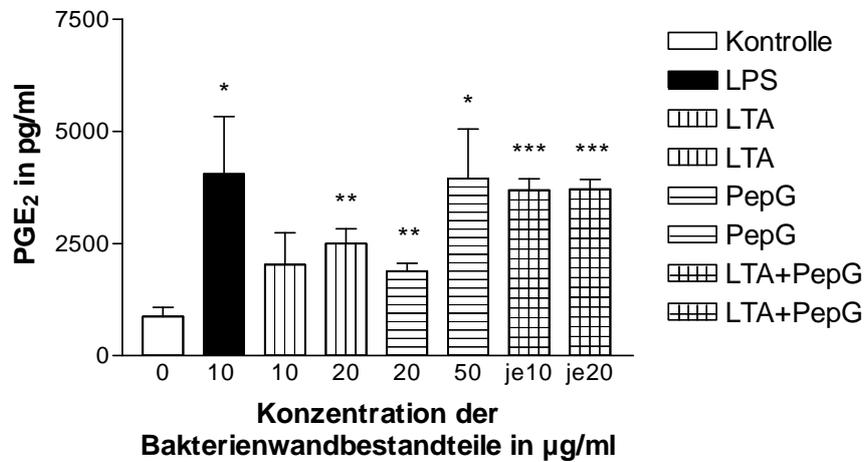
Perfusatanalyse: Zum Zeitpunkt 120 min wurden bei den mit LPS "geprimten" Lungen nur geringe Konzentrationen an TXB_2 , PGE_2 und 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ gemessen, die geringgradig höher lagen als bei den Kontrolllungen (Tab. 2c Anhang).

Zum Zeitpunkt 125 min konnte in den mit LPS stimulierten Lungen im Vergleich zu den Kontrolllungen ohne "LPS-Priming", parallel zu der gesteigerten AA-induzierten Reaktion der physiologischen Messgrößen ΔPAP , ΔVP und ΔW , eine erhöhte Anhäufung von AA-Metaboliten im Perfusat gemessen werden. Der deutliche Anstieg der TXB_2 -, PGE_2 - und 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentration innerhalb von 5 min nach AA-Applikation war knapp drei- bis fünfmal so hoch wie bei den Kontrolllungen (Abb. 13A-C, Tab. 2e Anhang).

A TXB₂-Gehalt zum Zeitpunkt 125'
bei "Priming" durch
Bakterienwandbestandteile



B PGE₂-Gehalt zum Zeitpunkt 125'
bei "Priming" durch
Bakterienwandbestandteile



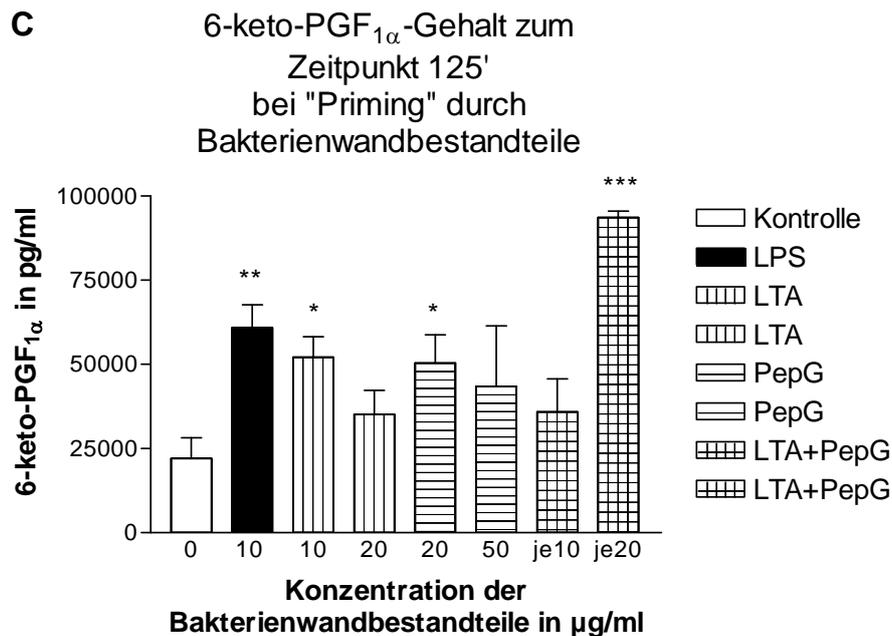


Abbildung 13A,B,C: Einfluss des "Primings" durch Bakterienwandbestandteile auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} nach AA-Applikation.

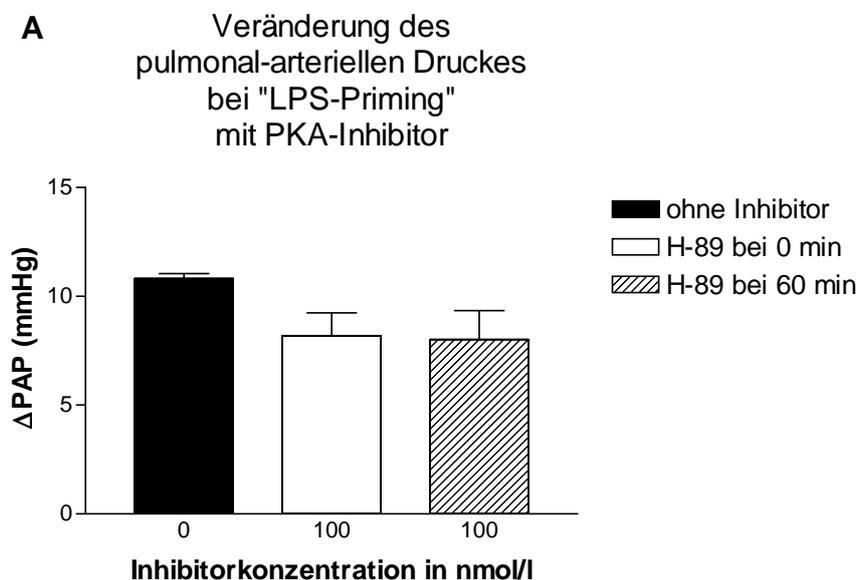
Die Lungen wurden ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle und in Anwesenheit von 10 μg/ml LPS, 10 und 20 μg/ml LTA, 20 und 50 μg/ml PepG, sowie 10 μg/ml LTA zusammen mit 10 μg/ml PepG und 20 μg/ml LTA zusammen mit 20 μg/ml PepG perfundiert. Nach 2 h wurde AA (10 μmol/l) dem Perfusat zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehaltes zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

In der vorliegenden Arbeit bewirkte das zweistündige "Priming" von isolierten Rattenlungen durch rezirkulierende Perfusion mit Endotoxin (LPS) keine Veränderung der physiologischen Messwerte PAP, VP und W. Erst die nachfolgende Verabreichung von AA führte zu einer, gegenüber den Kontrolllungen deutlich verstärkten, signifikanten Zunahme der Messwerte ΔPAP, ΔVP und ΔW, bei gleichzeitiger Zunahme des ermittelten Gehaltes an TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} im Perfusat.

4.2.2 Untersuchungen zum "gramnegativen Priming" mit Einsatz von verschiedenen Proteinkinase (PK)-Inhibitoren

Proteinkinase A-Inhibitor

Die Verabreichung des PKA-Inhibitors H-89 (100 nM) bei mit LPS (10 µg/ml) "geprimten" Lungen führte zu keiner signifikant abgeschwächten Reaktion der Messwerte Δ PAP, Δ VP und Δ W auf die AA-Gabe (Abb. 14A-C, Tab. 3a Anhang). Die Zugabe des Inhibitors zum Perfusat 5 min nach Beginn der LPS-Perfusion (Zeitpunkt 0 min) verminderte geringfügig, jedoch nicht signifikant den Anstieg von Δ PAP und Δ VP, aber nicht den von Δ W. Wurde der Inhibitor in gleicher Dosierung 60 min nach LPS gegeben, lag der Δ PAP-Wert ähnlich hoch wie bei der Gabe zum Zeitpunkt 0 min, der Δ VP wurde im Vergleich zu den Lungen ohne Inhibitor auf die Hälfte reduziert, allerdings nicht signifikant und Δ W stieg nur geringfügig weniger an als bei den ohne Inhibitor mit LPS behandelten Lungen.



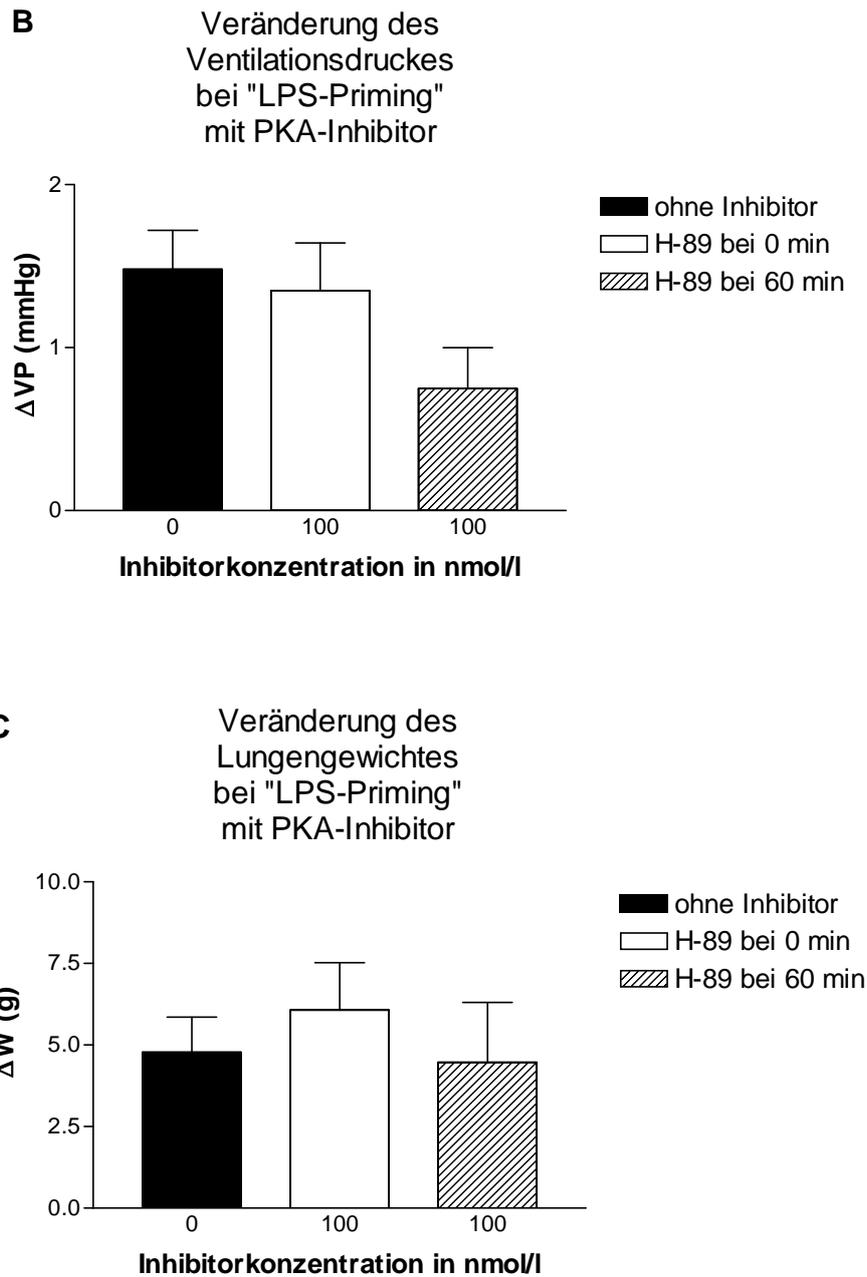
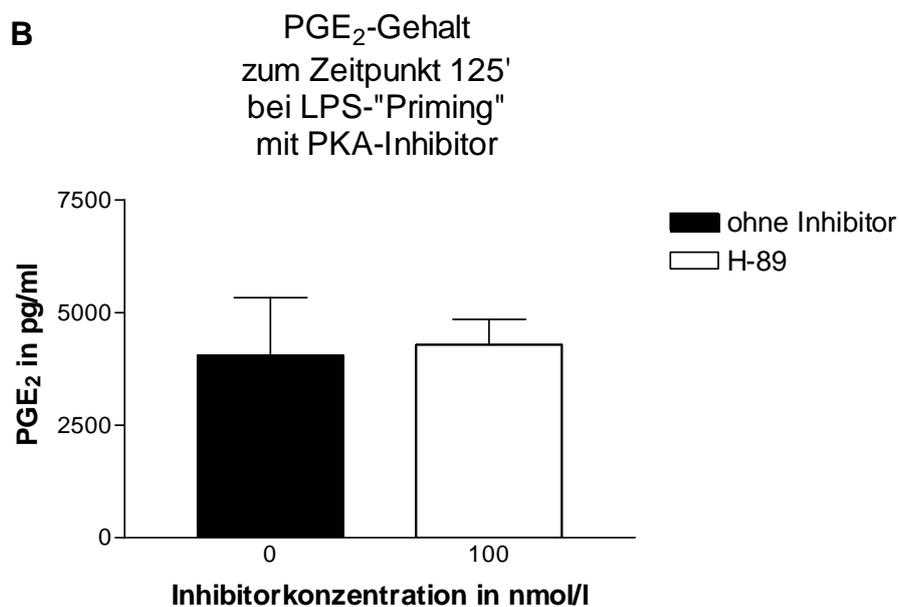
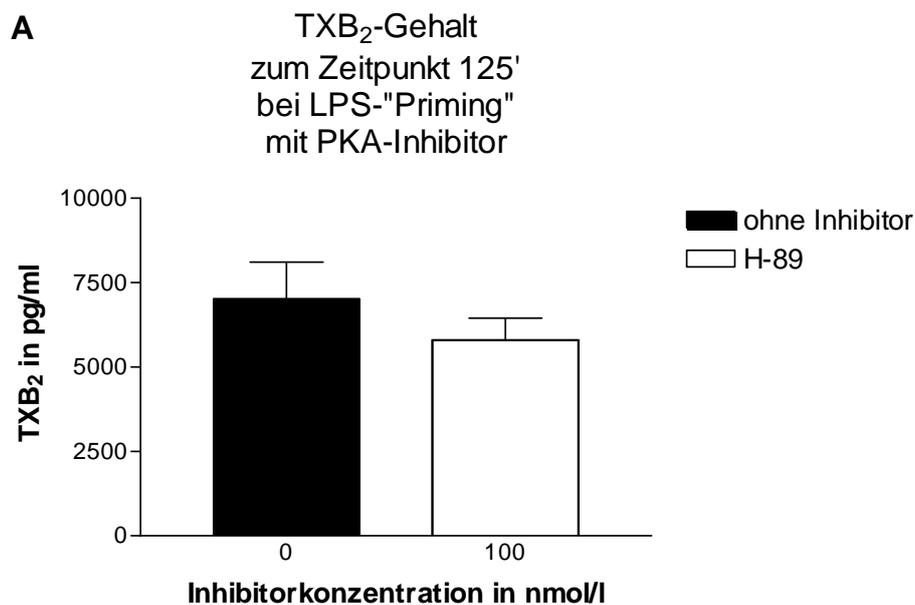


Abbildung 14A,B,C: Wirkung des "LPS-Primings" auf den AA-induzierten Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Δ PAP), Ventilationsdruckes (Δ VP) und Lungengewichtes (Δ W) in Abwesenheit und Anwesenheit eines PKA-Inhibitors.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 10 μ g/ml LPS perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe des PKA-Inhibitors H-89 erfolgte zum Zeitpunkt 0 bzw. 60 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

Perfusatanalyse: Auch bei der Messung der AA-Metabolite im Perfusat zum Zeitpunkt 125 min bei erfolgter Beimischung des PKA-Inhibitors H-89 (100 nM) zum Perfusat 60 min nach der LPS-Gabe zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den ohne Inhibitor mit LPS perfundierten Lungen (Abb. 15A-C, Tab. 3b Anhang). Lediglich die TXB₂-Konzentration lag unter dem bei diesen Lungen ermittelten Wert, allerdings nicht signifikant.



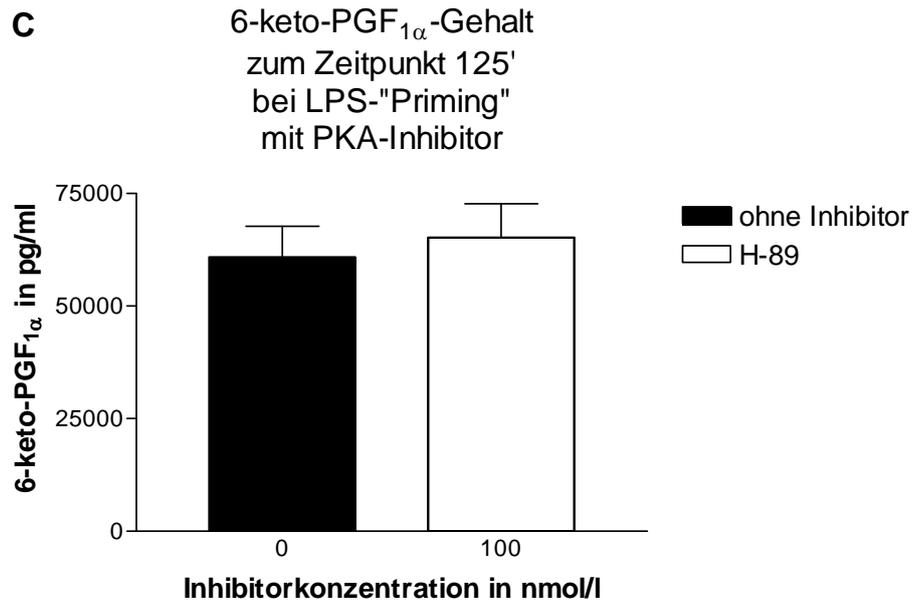


Abbildung 15A,B,C: Einfluss des "LPS-Primings" auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} nach AA-Applikation in Abwesenheit und Anwesenheit eines PKA-Inhibitors.

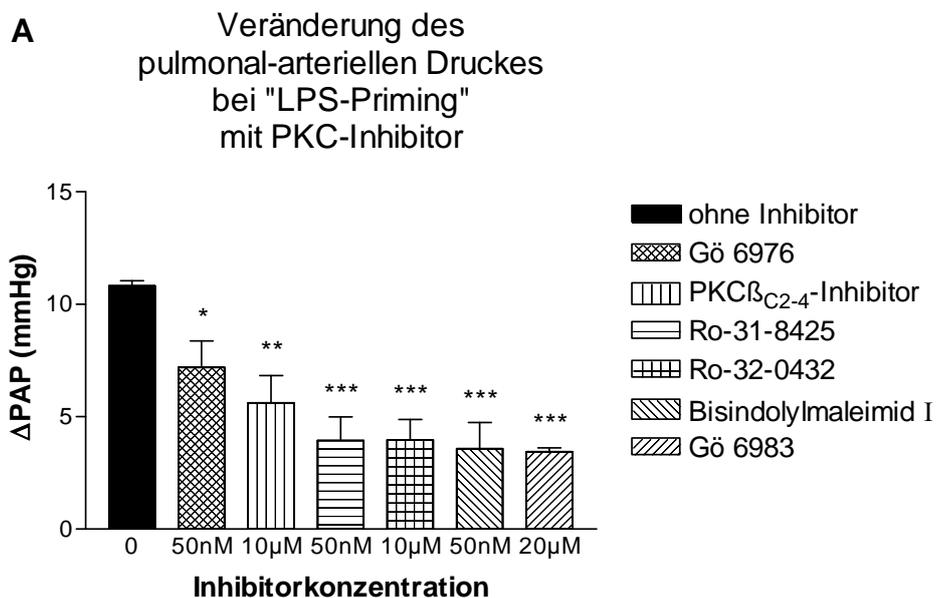
Die Lungen wurden in Anwesenheit von 10 µg/ml LPS perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 µmol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe des PKA-Inhibitors H-89 erfolgte zum Zeitpunkt 60 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehaltes im rezirkulierenden Perfusat in pg/ml zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe.

H-89 war in der angewendeten Konzentration (100 nM) nicht in der Lage, die durch Arachidonsäure ausgelöste Vasokonstriktion, Bronchokonstriktion und Gewichtseinlagerung in der durch zweistündige Perfusion mit Endotoxin stimulierten isolierten Rattenlunge zu verhindern. Die in der Lunge gebildeten und im Perfusat gemessenen Mengen an TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} waren nicht geringer als nach der AA-Verabreichung an die Rattenlungen, die ohne Inhibitor mit LPS "geprimt" wurden.

Proteinkinase C-Inhibitoren

Der Einsatz verschiedener Proteinkinase C-Inhibitoren zum Zeitpunkt 0 min bei Lungen, die durch zweistündige, rezirkulierende Perfusion mit LPS stimuliert wurden, zeigte eine unterschiedlich ausgeprägte Hemmwirkung auf die durch AA-Verabreichung ausgelöste Reaktion der isolierten Rattenlunge (Abb. 16A-C, Tab. 4a Anhang). Die aufgezeichneten Messwerterhöhungen innerhalb von 5 min

nach dem Zufügen von freier AA zum Perfusat wurden durch die PKC-Inhibitoren Gö 6976 (50 nM, Hemmung von PKC α , β _I, μ), Myristoylierter PKC β _{C2-4}-Inhibitor (10 μ M, Hemmung von PKC α , β _I, β _{II}, γ), Ro-31-8425 (50 nM, Hemmung von PKC α , β _I, β _{II}, γ , ϵ), Ro-32-0432 (10 μ M, Hemmung von PKC α , β _I, ϵ), Bisindolylmaleimid I (50 nM, Hemmung von PKC α , β _I, β _{II}, γ , δ , ϵ) und Gö 6983 (20 μ M, Hemmung von PKC α , β _I, β _{II}, γ , δ , μ , ζ) in dieser Reihenfolge in zunehmendem Maße inhibiert. Der Anstieg des Δ PAP wurde durch Gö 6976 im Vergleich zu den ohne Inhibitor mit LPS perfundierten Lungen nur gering und durch den Myristoylierten PKC β _{C2-4}-Inhibitor etwas mehr gehemmt. Die restlichen eingesetzten PKC-Inhibitoren konnten den Δ PAP auf durchschnittlich ein Drittel des bei den Lungen ohne Inhibitorzusatz ermittelten Wertes von 10.82 ± 0.22 mmHg reduzieren und er entsprach damit ungefähr dem in isolierten Rattenlungen ohne "LPS-Priming" nach AA-Zugabe zum Perfusat erreichten Wert von 3.88 ± 0.15 mmHg. Demnach konnte der durch LPS induzierte Δ PAP-Anstieg vollständig unterdrückt werden. Die Inhibitoren Bisindolylmaleimid I und Gö 6983 verringerten den Δ VP auf einen Mittelwert von 0.29 ± 0.13 und 0.32 ± 0.04 , die anderen Inhibitoren erreichten einen Mittelwert von 0,77 bis 0,87 mmHg, während der Δ VP der Lungen mit "LPS-Priming" ohne PKC-Inhibitor bei 1.48 ± 0.24 mmHg lag. Der Δ W betrug bei den verschiedenen Inhibitoren die Hälfte bis ein Fünftel der ermittelten Gewichtszunahme der mit LPS stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden.



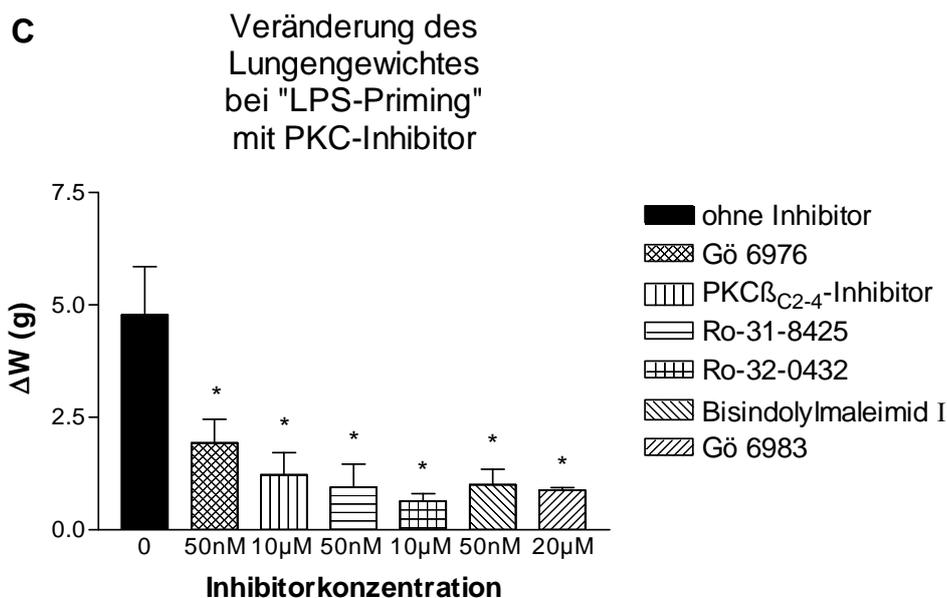
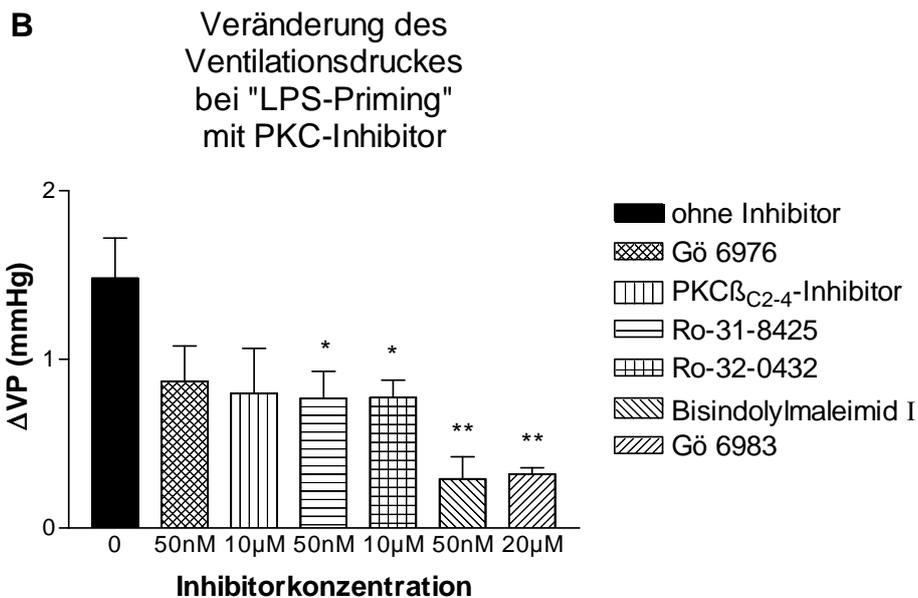
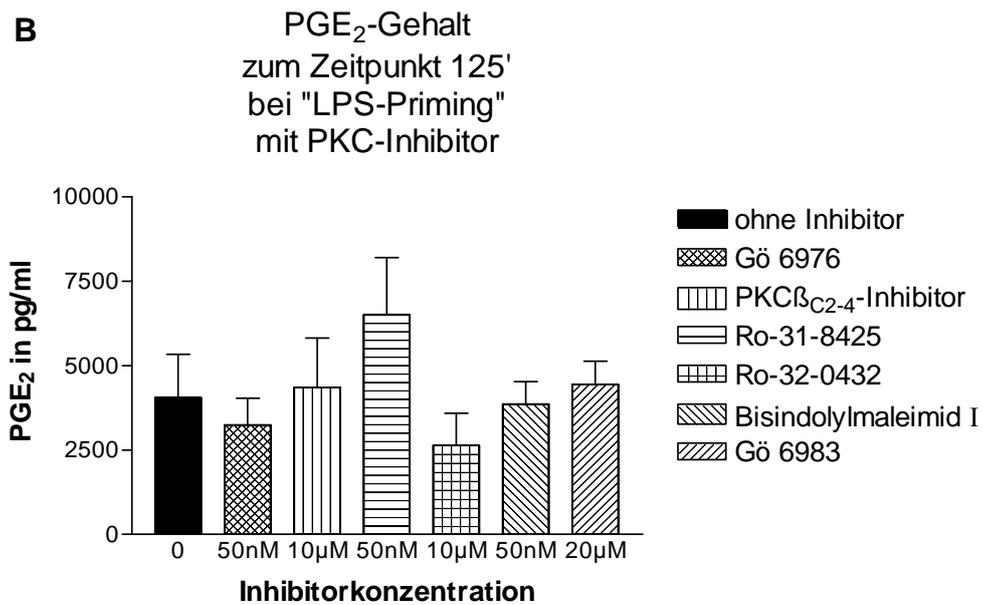
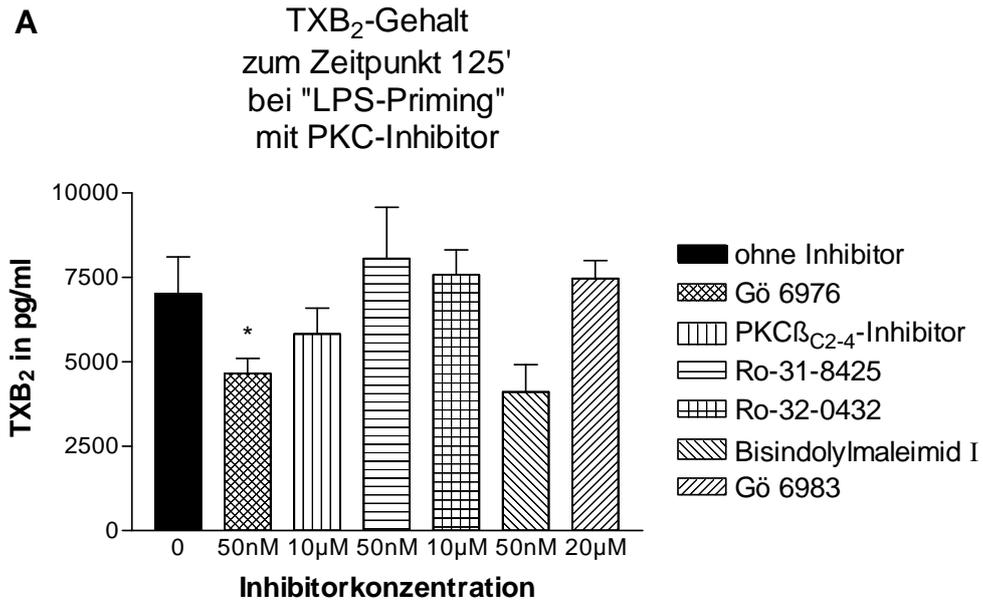


Abbildung 16A,B,C: Wirkung des "LPS-Primings" auf den AA-induzierten Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Δ PAP), Ventilationsdruckes (Δ VP) und Lungengewichtes (Δ W) in Abwesenheit und Anwesenheit von PKC-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 10 μ g/ml LPS perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der PKC-Inhibitoren Gö 6976, Myristoylierter PKC β_{C2-4} -Inhibitor, Ro-31-8425, Ro-32-0432, Bisindolylmaleimid I und Gö 6983 erfolgte zum Zeitpunkt 0 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LPS stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Perfusatanalyse: Die Produktion der AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} bei der Anwendung von PKC-Inhibitoren zeigte kaum Unterschiede zu den ohne PKC-Inhibitor mit LPS stimulierten Lungen (Abb. 17A-C, Tab. 4b Anhang). Gegenüber einem TXB₂-Gehalt von 7010.0 ± 1094.0 pg/ml bei den ohne Inhibitor perfundierten Lungen, wurde die TXB₂-Produktion lediglich durch den Inhibitor Gö 6976 signifikant auf einen Wert von 4649.0 ± 449.0 pg/ml reduziert. Bei den Inhibitoren Myristoylierter PKCβ_{C2-4}-Inhibitor und BisindolyImaleimid I waren die Werte nicht signifikant erniedrigt und bei den anderen Inhibitoren lagen die TXB₂-Mengen knapp über den bei den Lungen ohne Inhibitorgabe ermittelten Werten. Die PGE₂-Produktion konnte durch die Inhibitoren Gö 6976, Ro-32-0432 und BisindolyImaleimid I nicht signifikant geringfügig gehemmt werden im Vergleich zu den durch LPS stimulierten Lungen ohne Inhibitorverabreichung. Die anderen PKC-Inhibitoren konnten keine Hemmung der PGE₂-Bildung erzielen. Die 6-keto-PGF_{1α}-Konzentrationen lagen bei der Verwendung der Inhibitoren Gö 6976 und Ro-32-0432, im Vergleich zu der ermittelten Konzentration von 60870.0 ± 6860.0 pg/ml bei den ohne Inhibitor mit LPS behandelten Lungen, geringfügig niedriger, jedoch lediglich bei Gö 6976 war der Unterschied signifikant. Bei den Versuchen mit den Inhibitoren Myristoylierter PKCβ_{C2-4}-Inhibitor, BisindolyImaleimid I, Gö 6983 und Ro-31-8425 wurden höhere Konzentrationen an 6-keto-PGF_{1α} gemessen als bei den Vergleichslungen. Die ermittelten Mengen an 6-keto-PGF_{1α} waren bei dem Myristoylierten PKCβ_{C2-4}-Inhibitor und bei BisindolyImaleimid I mit 62990.0 ± 10820.0 und 69210.0 ± 14640.0 pg/ml 6-keto-PGF_{1α} leicht erhöht und bei Gö 6983 und Ro-31-8425 mit 85490.0 ± 18590.0 und 90520.0 ± 19220.0 pg/ml 6-keto-PGF_{1α} deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht.



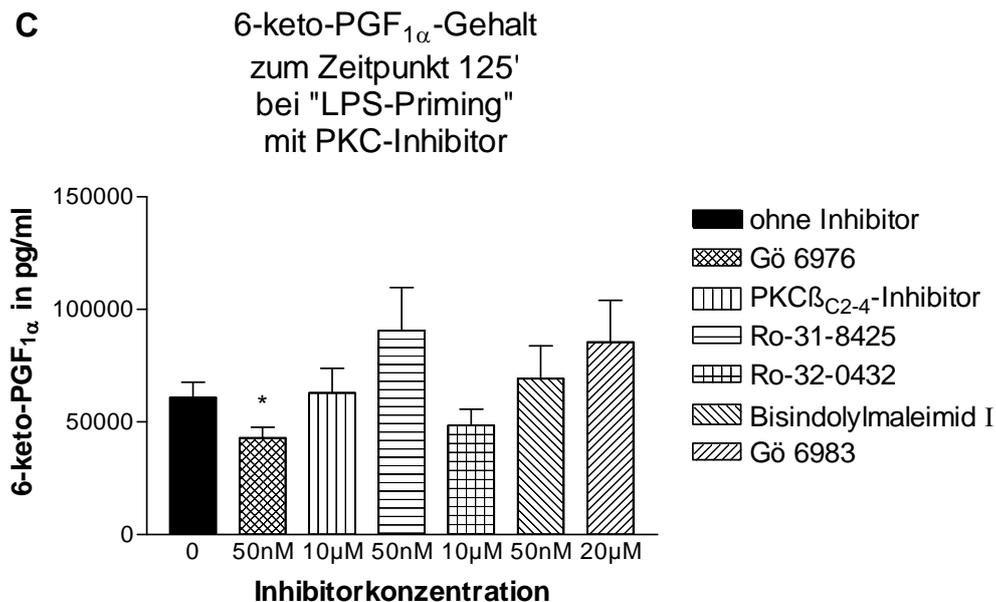


Abbildung 17A,B,C: Einfluss des "LPS-Primings" auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} nach AA-Applikation in Abwesenheit und Anwesenheit von PKC-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 10 µg/ml LPS perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 µmol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der PKC-Inhibitoren Gö 6976, Myristoylierter PKCβ_{C2-4}-Inhibitor, Ro-31-8425, Ro-32-0432, Bisindolylmaleimid I und Gö 6983 erfolgte zum Zeitpunkt 0 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehaltes im rezirkulierenden Perfusat in pg/ml zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LPS stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * p<0.05.

Die Anwendung verschiedener Proteinkinase C-Inhibitoren bei mit LPS "geprimten" Rattenlungen zeigte eine Hemmwirkung auf die durch die Verabreichung des zweiten inflammatorischen Stimulus AA ausgelösten, messbaren Reaktionen der Lungen: Gewichtszunahme, Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes und Ventilationsdruckes. Die Liberation der im Perfusat gemessenen AA-Metabolite dagegen war teilweise tendenziell reduziert, teilweise nicht signifikant erhöht, im Prinzip unverändert.

4.2.3 Untersuchungen zum "grampositiven Priming"

Ohne Zugabe von Arachidonsäure in das Perfusat lag der ΔPAP-Wert nach der zweistündigen rezirkulierenden Perfusion mit Applikation von 10 beziehungsweise 20 µg/ml LTA zum Zeitpunkt 0 min nicht höher als bei den Kontrolllungen. Bei der alleinigen Gabe von PepG und der kombinierten Gabe von LTA und PepG stieg der

fortlaufend registrierte PAP dagegen zwischen den Zeitpunkten 0 und 120 min signifikant an (Tab. 2b Anhang). Bei der Gabe von 20 und 50 µg/ml PepG und je 10 µg/ml LTA zusammen mit 10 µg/ml PepG lagen die Werte des Δ PAP nach 120 min deutlich höher als die bei den Kontrolllungen aufgezeichneten Werte. Bei der Stimulation der Lungen durch je 20 µg/ml LTA und PepG war mit 2.34 ± 0.24 mmHg der größte Δ PAP zwischen 0 und 120 min festzustellen.

In den Untersuchungen mit Applikation von AA nach 120 min war in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration der Zellwandkomponenten LTA und PepG grampositiver Bakterien sowie ihrer alleinigen oder kombinierten Verabreichung, eine gesteigerte Reaktion von Δ PAP, Δ VP und Δ W im Vergleich zu den Kontrolllungen zu verzeichnen (Abb. 12A-C, Tab. 2d Anhang).

Bei der Verabreichung von 10 µg/ml LTA war der Δ PAP mit 4.43 ± 0.53 mmHg kaum höher als bei den Kontrolllungen 5 min nach AA-Applikation. Eine Konzentrationserhöhung auf 20 µg/ml LTA verdoppelte die Δ PAP-Differenz signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Δ VP lag in der Versuchsgruppe mit 10 µg/ml LTA nicht signifikant 2.4-mal so hoch wie bei den Lungen ohne Stimulation und die Gabe der doppelten Dosis LTA erbrachte eine signifikante Erhöhung der Messparameterreaktion um etwa das 5fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Reaktion der Lunge mit Gewichtszunahme fiel bei der Verabreichung von 20 µg/ml LTA, mit einem 7.6-mal höheren Wert als bei den Kontrolllungen deutlich stärker aus als die nur geringe Δ W-Zunahme nach der Gabe von 10 µg/ml LTA.

Bei der Stimulation der Rattenlungen durch PepG war eine Konzentration von 20 µg/ml nötig, um nach der AA-Gabe signifikante Unterschiede von Δ PAP, Δ VP und Δ W gegenüber der Kontrolle zu erreichen. Durch eine Erhöhung der Konzentration auf 50 µg/ml Pep G im Perfusat wurde nur bei Δ VP eine leichte weitere Steigerung der Messwerte erreicht, jedoch konnten beide PepG-Konzentrationen nicht so große Messwerterhöhungen verzeichnen wie 20 µg/ml LTA mit anschließender AA-Applikation.

Erst die Verabreichung von LTA und PepG in Kombination bewirkte einen besonders deutlich verstärkten Anstieg von Δ PAP, Δ VP und Δ W im Vergleich zu den

Kontrolllungen, die ohne vorherigen bakteriellen Stimulus mit AA behandelt wurden. Die Gabe von jeweils 10 µg/ml LTA und PepG erhöhte den Δ PAP im Vergleich zu den Kontrolllungen um ungefähr das 2.5fache und bei einer Konzentration von je 20 µg/ml wurde eine Steigerung des Δ PAP um das 3.4fache erreicht. Parallel dazu bewirkte die Kombination von LTA und PepG in der Konzentration von je 10 µg/ml eine 6.7-mal größere Steigerung des Δ VP und bei je 20 µg/ml den 13fachen Wert der Kontrollversuche. Hier zeigte sich also eine deutlich gesteigerte Reaktion der Lungen auf freie AA. Die kombinierte Gabe von LTA und PepG bewirkte auch bei dem Δ W die deutlichste Veränderung unter den Versuchsgruppen mit grampositiver Stimulation, mit einer Gewichtseinlagerung von 6.03 ± 2.13 g bei je 10 µg/ml LTA und PepG und 11.77 ± 0.80 g bei je 20 µg/ml, gegenüber 0.63 ± 0.17 g bei den Lungen ohne Stimulation. Die Stimulation der isolierten Rattenlunge durch die kombinierte Gabe von je 20 µg/ml LTA und PepG ergab also eine eindeutige und hochsignifikante Erhöhung der aufgezeichneten Messwerte 5 min nach AA-Gabe im Vergleich zu den Kontrolllungen und löste eine stärkere Reaktion der isolierten Rattenlunge aus als bei der alleinigen Gabe von LTA oder PepG.

Perfusatanalyse: Nach 120 min rezirkulierender Perfusion der mit grampositiven Bakterienwandsbestandteilen stimulierten Lungen waren geringe Mengen der AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1 α} in dem Perfusat messbar (Tab. 2c Anhang). Vor allem bei den Versuchsgruppen mit alleiniger Verabreichung von PepG sowie kombinierter Verabreichung von LTA und PepG wurden parallel zu den vergleichsweise höheren Δ PAP-Werten auch größere Eikosanoidmengen als bei den Kontrolllungen gemessen (Tab. 2c Anhang).

Die Beifügung von AA zum Perfusat der mit LTA und PepG alleine oder in Kombination stimulierten Lungen bewirkte im Vergleich zu den ohne vorherigen bakteriellen Stimulus mit AA behandelten Kontrolllungen eine gesteigerte Produktion von AA-Metaboliten in der Lunge (Abb. 13A-C, Tab. 2e Anhang). Der TXB₂-Gehalt lag um das zwei- bis dreifache höher als bei den Kontrolllungen, wobei die Versuchsgruppe, in der 50 µg/ml PepG verabreicht wurde geringfügig, aber nicht signifikant höhere Werte erzielte als die kombinierte Gabe von LTA und PepG, gefolgt von den anderen Versuchsgruppen. Die ermittelten PGE₂-Konzentrationen

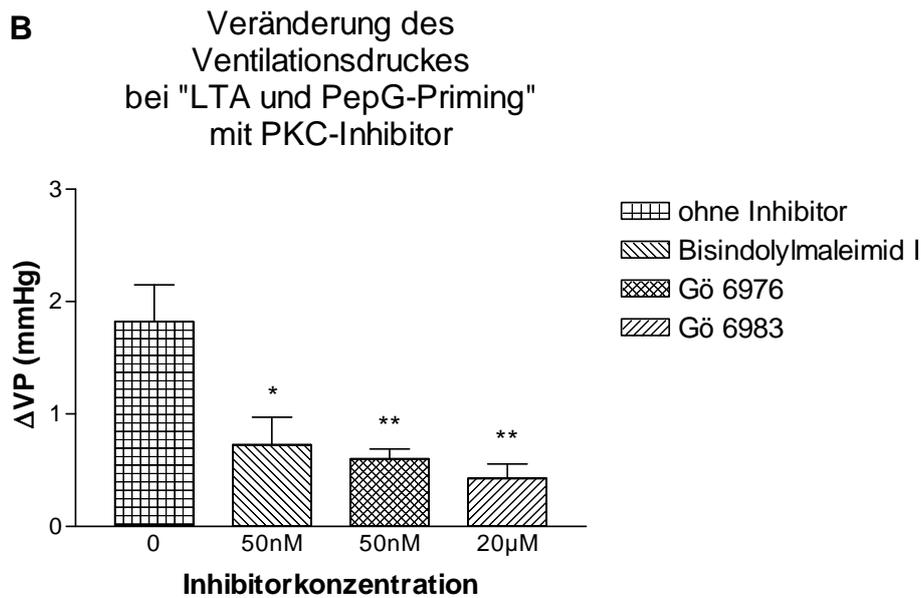
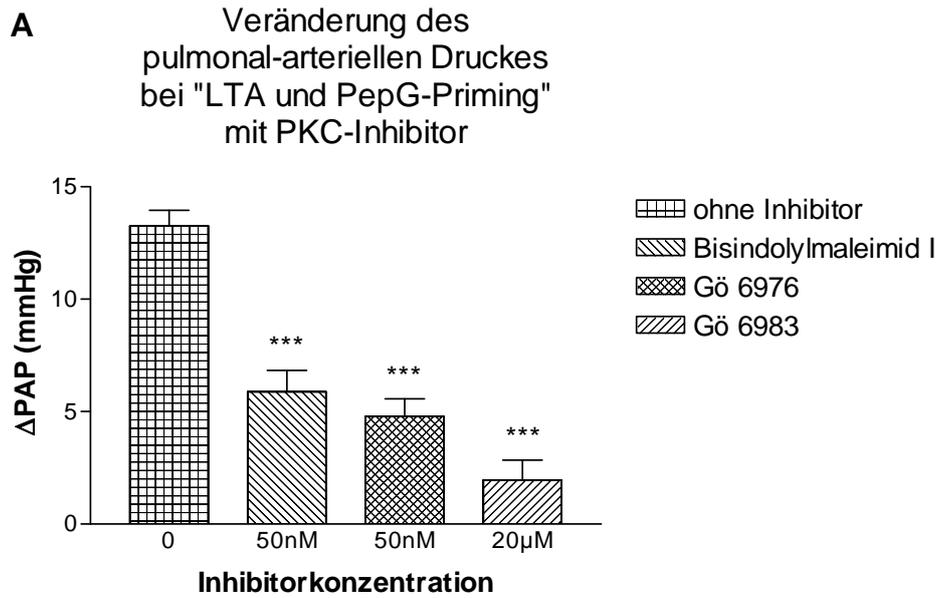
ergaben ein ähnliches Bild, mit einem signifikanten, ungefähr vierfach höheren Konzentrationsanstieg im Vergleich zu den Kontrolllungen nach der Verabreichung von 50 µg/ml PepG und in der Versuchsgruppe der kombinierten LTA- und PepG-Gabe, gegenüber einem nur ungefähr zwei- bis dreifach erhöhten PGE₂-Gehalt in den restlichen Versuchsgruppen. Auch die im Perfusat vorhandene Menge an 6-keto-PGF_{1α} stieg innerhalb von 5 min nach AA-Applikation wesentlich deutlicher an als bei den Kontrolllungen. Der höchste Gehalt an 6-keto-PGF_{1α} konnte in der Versuchsgruppe mit jeweils 20 µg/ml LTA und PepG gemessen werden, der hochsignifikant 4.2-mal höher lag als bei den Kontrolllungen. In den anderen Versuchsgruppen wurden 1.6- bis 2.3-mal höhere Konzentrationen an 6-keto-PGF_{1α} festgestellt. Die grampositive Stimulation konnte, ähnlich der Stimulation durch gramnegatives LPS, eine Konzentrationszunahme der AA-Metabolite im Perfusat in unterschiedlichem Ausmaß bei den verschiedenen Versuchsgruppen auslösen. Signifikante Erhöhungen zeigten sich hauptsächlich in der Gruppe der kombinierten Verabreichung von LTA und PepG, sowie bei alleiniger Verabreichung von PepG und LTA in höherer Dosierung.

Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich, dass die Wandbestandteile grampositiver Bakterien, ähnlich wie die gramnegativer Bakterien, in der Lage sind, eine erhöhte pulmonale Reaktivität in isolierten Rattenlungen auszulösen. Während die alleinige Gabe von PepG eine mäßig gesteigerte und die alleinige Gabe von LTA eine etwas stärker erhöhte vaskuläre und bronchiale Reaktivität der Rattenlunge auf den sekundären Stimulus AA verursachte, bewirkte die kombinierte Gabe der grampositiven Bakterienwandbestandteile LTA und PepG eine deutliche "Priming"-Reaktion, mit ausgeprägtem Anstieg des pulmonalen und vaskulären Druckes und sehr starker Lungengewichtszunahme. Gleichzeitig kam es zu einer Zunahme der Bildung von AA-Metaboliten. Die kombinierte Verabreichung von LTA zusammen mit PepG hatte eine stärkere pulmonale Reaktion zur Folge als die alleinige Verabreichung von LTA und PepG, ebenso eine Erhöhung der Dosis auf das zweifache bei alleiniger Verabreichung von LTA beziehungsweise PepG.

4.2.4 Untersuchungen zum “grampositiven Priming“ mit Einsatz von verschiedenen Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion sowie Zyklooxygenase (Cox)-2-Inhibitoren

Proteinkinase C-Inhibitoren

Der Einsatz der Proteinkinase C-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I (50 nM), Gö 6976 (50 nM) und Gö 6983 (20 µM) zum Zeitpunkt 0 min zeigte bei den mit jeweils 20 µg/ml LTA und PepG stimulierten Lungen eine deutliche Hemmung der 5 min nach Applikation freier AA auftretenden Messwertveränderungen (Abb. 18A-C, Tab. 5a Anhang). Bei allen drei Messparametern Δ PAP, Δ VP und Δ W zeigte der Inhibitor Gö 6983 die größte Hemmwirkung auf die AA-induzierte Reaktion der Lungen, gefolgt von dem Inhibitor Gö 6976 und Bisindolylmaleimid I. Der Δ PAP wurde ausgehend von den ermittelten 13.26 ± 0.70 mmHg bei den mit LTA und PepG sowie nach 120 min mit AA stimulierten Lungen ohne Inhibitorzugabe bei Bisindolylmaleimid I mit einem Wert von 5.88 ± 0.96 mmHg auf ungefähr die Hälfte, bei Gö 6976 mit 4.78 ± 0.79 mmHg auf ein Drittel und bei Gö 6983 mit 1.95 ± 0.89 mmHg auf ein Siebtel abgesenkt. Der PKC-Inhibitor Gö 6983 unterdrückte den Δ PAP damit auch signifikant unter den bei den Kontrolllungen gemessenen Wert von 3.88 ± 0.15 mmHg nach AA-Verabreichung ohne vorheriges “LTA und PepG-Priming“. Die Hemmwirkung auf den Δ VP zeigte sich in gleicher Verteilung und ähnlichem Ausmaß mit Werten von 1.82 ± 0.33 mmHg zum Zeitpunkt 125 min bei den mit LTA und PepG stimulierten Lungen ohne Inhibitorverabreichung im Vergleich zu 0.73 ± 0.25 mmHg bei Verwendung von Bisindolylmaleimid I, 0.60 ± 0.09 mmHg bei Einsatz von Gö 6976 und 0.43 ± 0.13 mmHg bei Gö 6983-Anwendung. Die Gewichtszunahme der Lungen innerhalb von 5 min nach AA-Applikation wurde durch alle drei Inhibitoren fast vollständig verhindert mit einem Δ W von 1.34 ± 0.49 g bei Bisindolylmaleimid I, 1.06 ± 0.30 g bei Gö 6976 und 0.29 ± 0.07 g bei Gö 6983 gegenüber 11.77 ± 0.80 g bei den ohne Inhibitor mit LTA und PepG “geprimten“ Lungen (Abb. 18A-C, Tab. 5a Anhang).



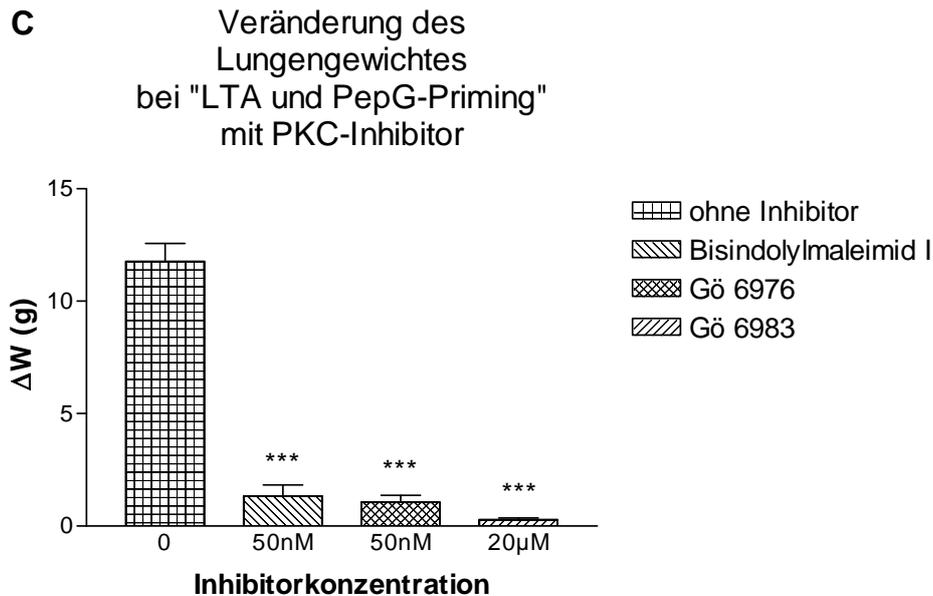
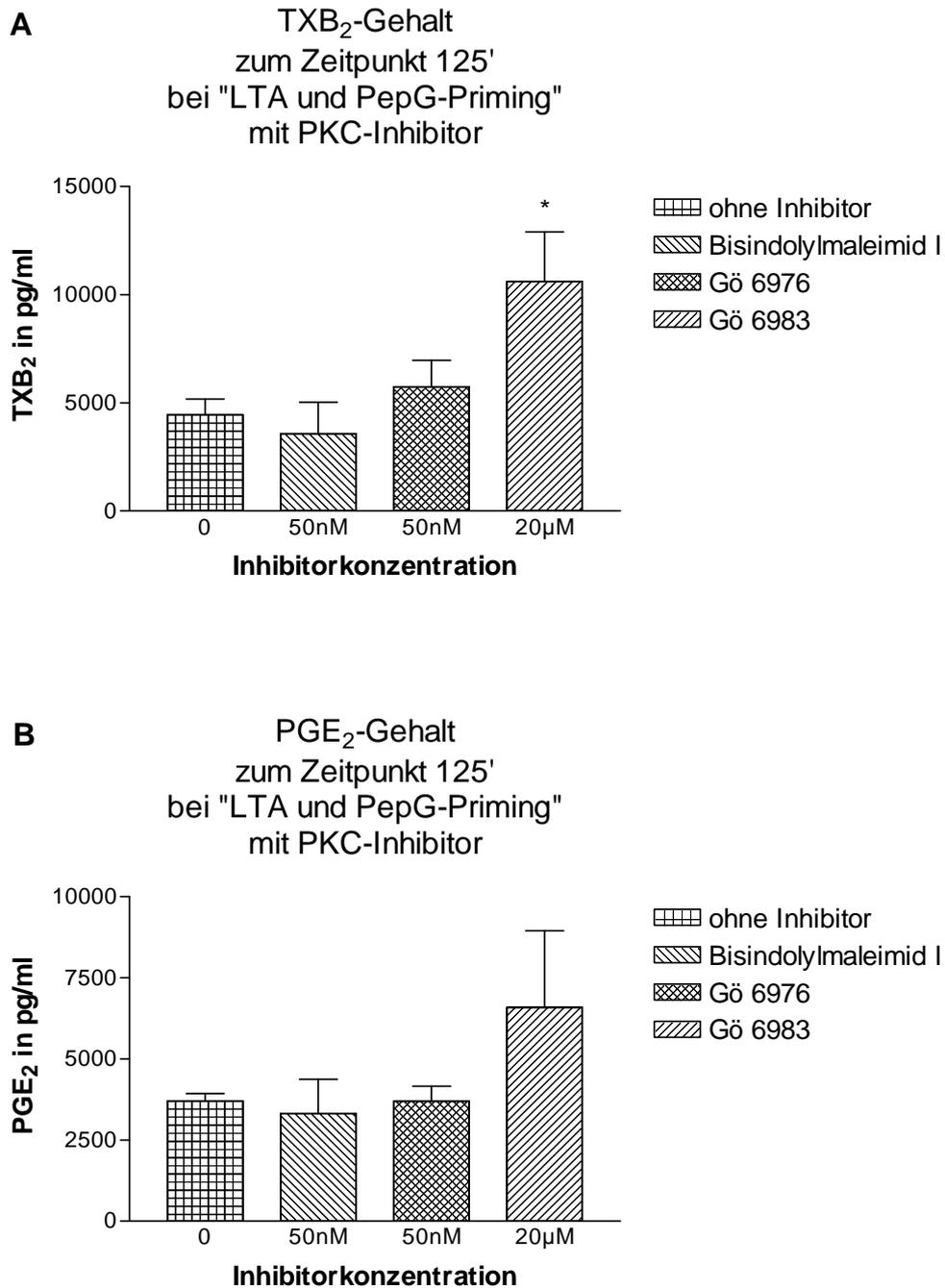


Abbildung 18A,B,C: Wirkung des "LTA und PepG-Primings" auf den AA-induzierten Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Δ PAP), Ventilationsdruckes (Δ VP) und Lungengewichtes (Δ W) in Abwesenheit und Anwesenheit von PKC-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 μ g/ml LTA und 20 μ g/ml PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I, Gö 6976 und Gö 6983 erfolgte zum Zeitpunkt 0 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Perfusatanalyse: Der durch freie AA induzierte Anstieg der AA-Metabolite konnte bei den durch LTA und PepG stimulierten Lungen von den PKC-Inhibitoren entweder gar nicht oder nicht so stark gehemmt werden wie der Anstieg der physiologischen Messwerte (Abb. 19A-C, Tab. 5b Anhang). Bei den Messungen des TXB₂-Gehaltes ergaben sich minimal reduzierte Werte bei Bisindolylmaleimid I, während für Gö 6976 leicht und für Gö 6983 sogar signifikant erhöhte TXB₂-Konzentrationen im Vergleich zu den ohne Inhibitoren mit LTA und PepG stimulierten Lungen ermittelt wurden. Die gemessenen PGE₂-Konzentrationen lagen in der Versuchsgruppe mit Bisindolylmaleimid I und Gö 6976 in dem Bereich der ohne Inhibitor stimulierten Lungen, während bei Gö 6983 fast doppelt so hohe Werte wie bei den Lungen ohne Inhibitorzugabe festgestellt wurden. Lediglich die im Perfusat gemessene Menge an 6-keto-PGF_{1 α} lag bei den Inhibitoren Bisindolylmaleimid I und Gö 6976 ungefähr um die Hälfte niedriger als bei den ohne PKC-Inhibitor mit LTA und PepG stimulierten Lungen. Der Inhibitor Gö 6983 zeigte keine Hemmung der 6-keto-PGF_{1 α} -Bildung; es ergaben sich ähnliche Messwerte wie bei den Versuchen ohne Inhibitor. Bei den drei

bestimmten AA-Metaboliten wurde bei der Verabreichung des Inhibitors Gö 6983 jeweils eine höhere Konzentration gemessen als bei Gö 6976, gefolgt von Bisindolylmaleimid I.



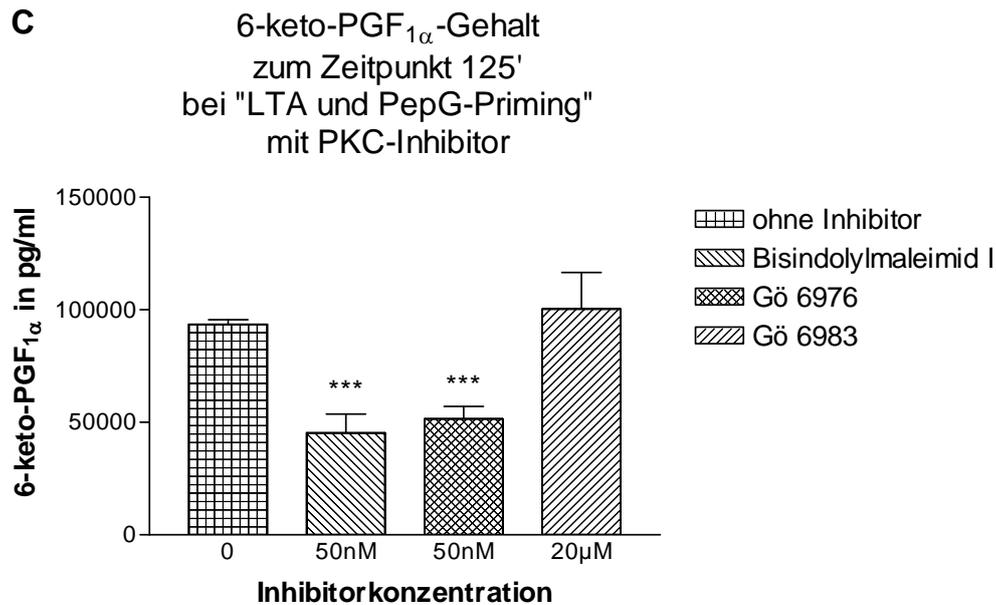


Abbildung 19A,B,C: Einfluss des "LTA und PepG-Primings" auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} nach AA-Applikation in Abwesenheit und Anwesenheit von PKC-Inhibitoren.

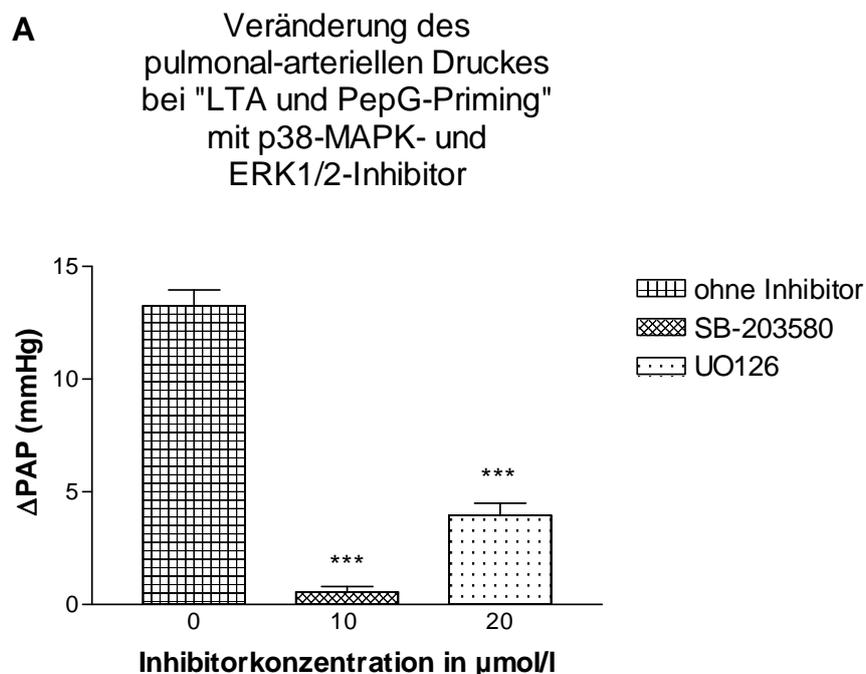
Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 µg/ml LTA und 20 µg/ml PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 µmol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I, Gö 6976 und Gö 6983 erfolgte zum Zeitpunkt 0 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehaltes im rezirkulierenden Perfusat in pg/ml zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * p<0.05, *** p<0.001.

Die drei eingesetzten PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I, Gö 6976 und Gö 6983 waren in der Lage, die durch LTA und PepG ausgelöste "Priming"-Reaktion in der isolierten Rattenlunge, gekennzeichnet durch gesteigerte Reaktion von ΔPAP, ΔVP und ΔW nach AA-Verabreichung, deutlich zu hemmen. Die in den Perfusatanalysen gemessenen Mengen der Eikosanoidmetabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} lagen bei dem Einsatz der PKC-Inhibitoren partiell unter den Werten der ohne PKC-Inhibitor mit LTA und PepG stimulierten Lungen, partiell darüber.

Mitogen aktivierte Proteinkinase-Inhibitoren

In isoliert perfundierten Rattenlungen, die der Stimulation durch LTA und PepG (20 µg/ml + 20 µg/ml) für 2 h unterzogen wurden, beeinflusste die Verabreichung des p38-MAPK-Inhibitors SB-203580 (10 µM) und des ERK1/2-Inhibitors UO126 (20 µM)

jeweils 60 min nach Stimulantiengabe die durch freie AA induzierte und sich in den Messwerten Δ PAP, Δ VP und Δ W widerspiegelnde Reaktion der Lunge sehr deutlich (Abb. 20A-C, Tab. 6a Anhang). Der p38-MAPK-Inhibitor SB-203580 war in der Lage den Anstieg der Δ PAP-, Δ VP- und Δ W-Werte nach AA-Applikation fast vollständig zu verhindern. Unter dem Einsatz von SB-203580 ergab sich ein Δ PAP von 0.55 ± 0.25 mmHg der damit sowohl signifikant niedriger lag als der bei den mit LTA und PepG "geprimten" und ohne Inhibitoranwendung nach 120 min mit AA stimulierten Lungen ermittelte Wert von 13.26 ± 0.7 mmHg als auch signifikant erniedrigt war gegenüber dem bei den lediglich mit AA stimulierten Kontrolllungen gemessenen Δ PAP von 3.88 ± 0.15 mmHg. Bei den Lungen, die zusätzlich zu den Stimulantien LTA und PepG mit dem ERK1/2-Inhibitor UO126 perfundiert wurden, betrug der Δ PAP 5 min nach AA-Gabe weniger als ein Drittel des Δ PAP der ohne Inhibitorzugabe perfundierten Lungen. Entsprechend dem Δ PAP wurde der Anstieg von Δ VP und Δ W durch UO126 nahezu komplett gehemmt. Beide MAPK-Inhibitoren erzielten eine deutliche, signifikante Hemmung der durch grampositive Stimulation induzierten vaskulären und bronchialen Drucksteigerungen sowie der Gewichtserhöhung.



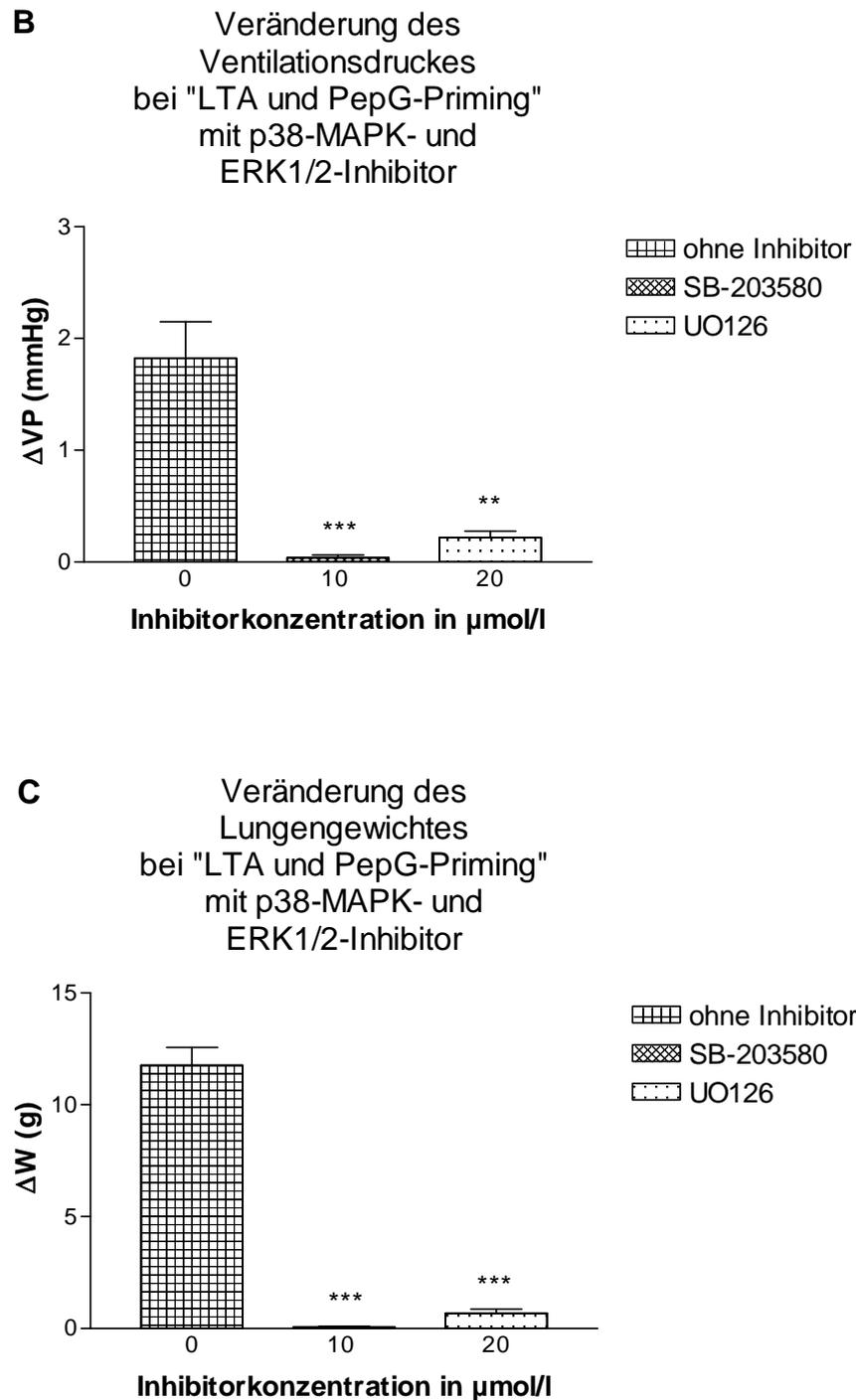
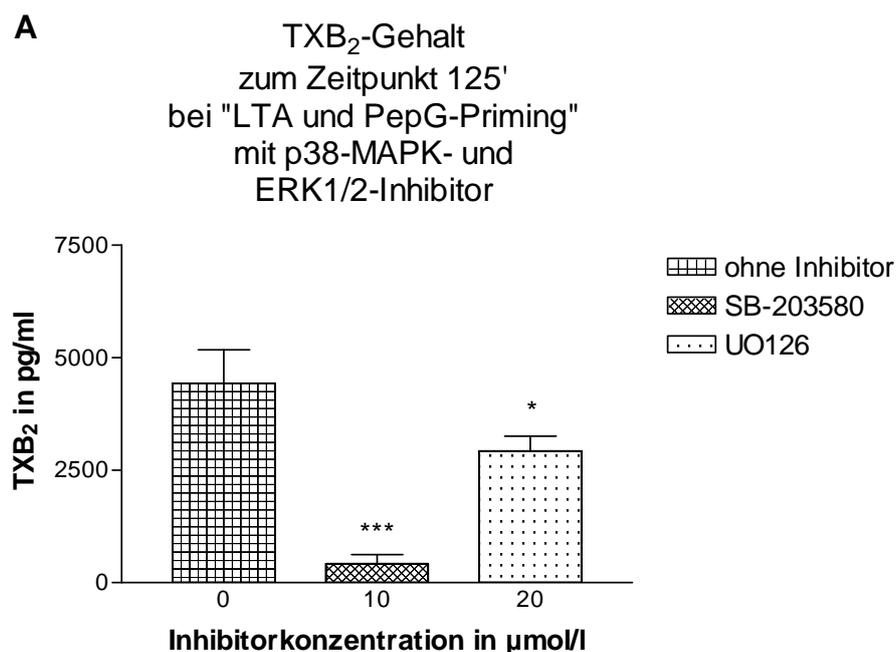


Abbildung 20A,B,C: Wirkung des "LTA und PepG-Primings" auf den AA-induzierten Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Δ PAP), Ventilationsdruckes (Δ VP) und Lungengewichtes (Δ W) in Abwesenheit und Anwesenheit von MAPK-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 μ g/ml LTA und 20 μ g/ml PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe des p38-MAPK-Inhibitors SB-203580 und des ERK1/2-Inhibitors UO126 erfolgte zum Zeitpunkt 60 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Perfusatanalyse: Die Menge der messbaren AA-Metabolite 5 min nach AA-Verabreichung war bei den Lungen, die nach Stimulation durch LTA und PepG mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB-203580 perfundiert wurden, deutlich vermindert gegenüber den Lungen, denen kein Inhibitor verabreicht wurde (Abb. 21A-C, Tab. 6b Anhang). Bei der Verwendung des p38-MAPK-Inhibitors SB-203580 ergab sich mit einem Wert von 424.0 ± 195.4 pg/ml ein deutlich geringerer Anstieg des TXB₂-Gehaltes im Perfusat nach AA-Gabe als bei den grampositiv stimulierten Lungen ohne Inhibitorverwendung mit 4431.0 ± 742.0 pg/ml TXB₂ und auch ein signifikant verminderter Anstieg gegenüber den Kontrolllungen, die ohne vorhergehendes bakterielles "Priming" mit AA behandelt wurden und eine TXB₂-Konzentration von 2220.0 ± 543 pg/ml aufwiesen (Tab. 2e Anhang, Tab. 6b Anhang). Der Gehalt an PGE₂ und 6-keto-PGF_{1 α} im Perfusat betrug ungefähr 30 % der Werte bei den Vergleichslungen ohne Inhibitor.

Der ERK1/2-Inhibitor UO126 hemmte den Anstieg der Metabolite TXB₂ und PGE₂ um ein Drittel und ein Viertel der bei den ohne Inhibitor mit LTA und PepG "geprimten" Lungen ermittelten Werte. Er erzielte keine Hemmung der 6-keto-PGF_{1 α} -Produktion (Abb. 21A-C, Tab. 6b Anhang).



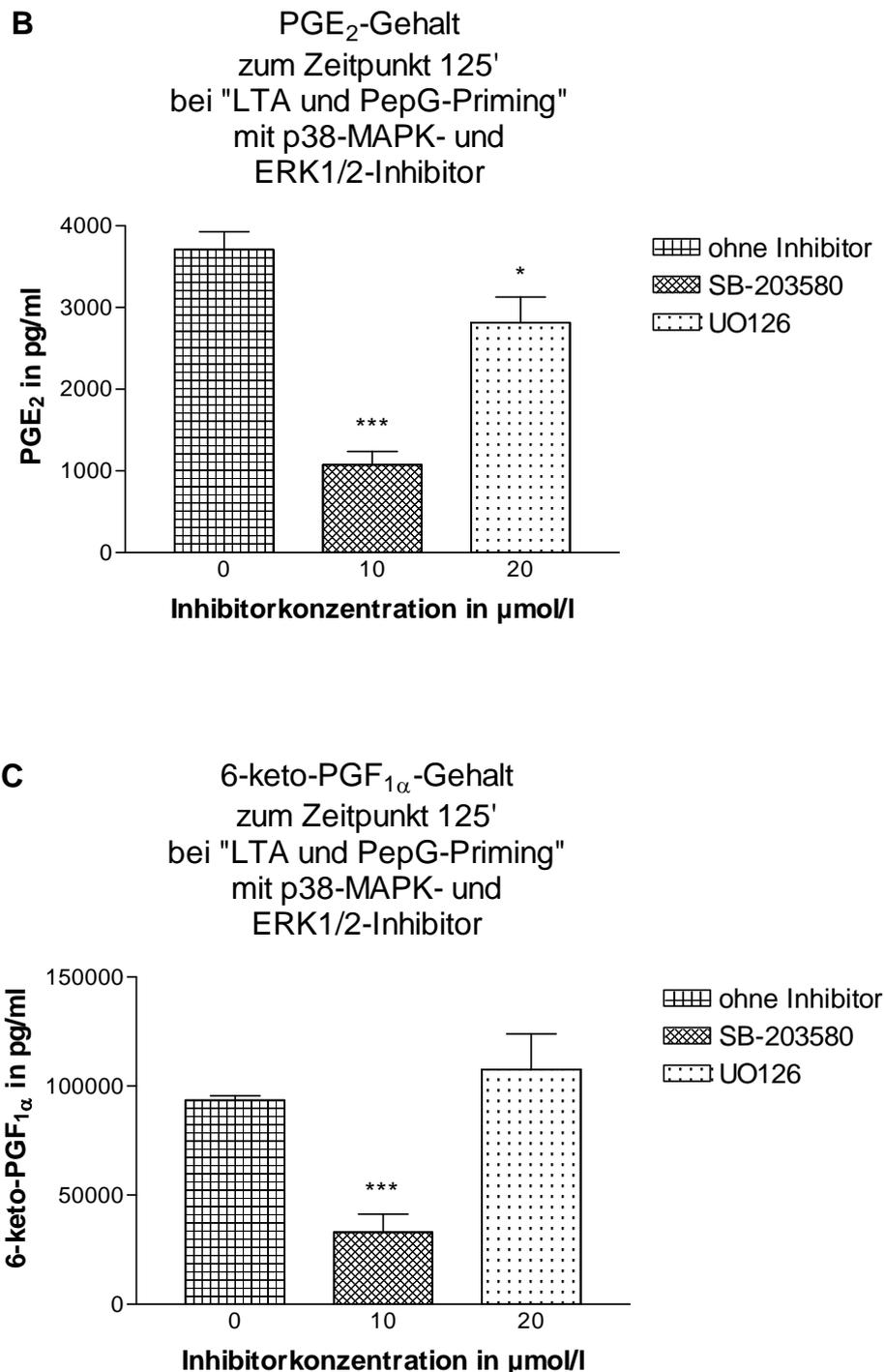


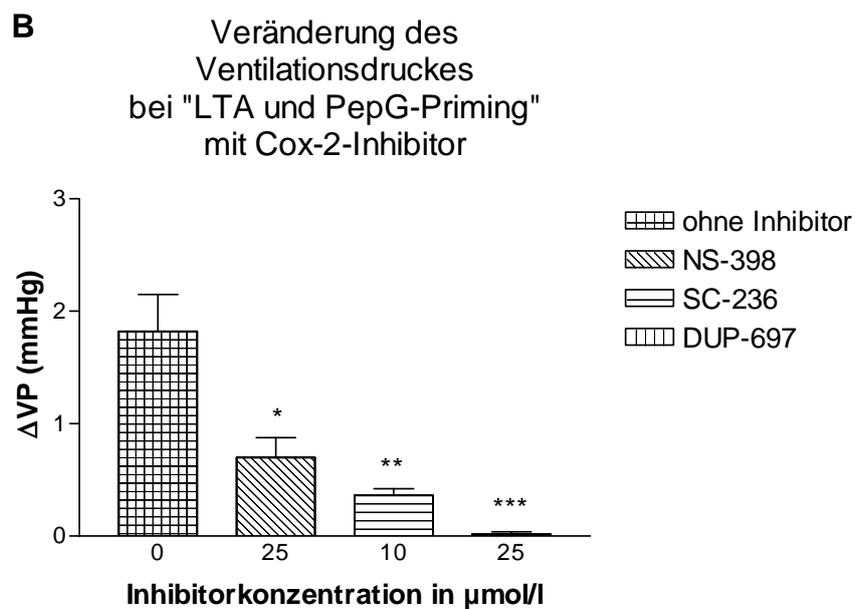
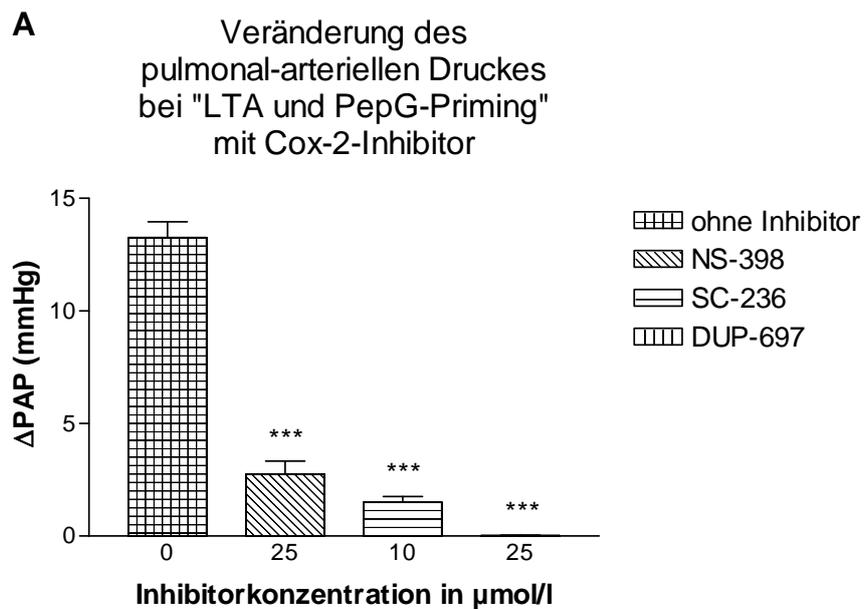
Abbildung 21A,B,C: Einfluss des "grampositiven Primings" auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} nach AA-Applikation in Abwesenheit und Anwesenheit von MAPK-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 µg/ml LTA und 20 µg/ml PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 µmol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe des p38-MAPK-Inhibitors SB-203580 und des ERK1/2-Inhibitors UO126 erfolgte zum Zeitpunkt 60 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehaltes im rezirkulierenden Perfusat in pg/ml zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * p<0.05, *** p<0.001.

Die Verabreichung des ERK1/2-Inhibitors UO126 und vor allem des p38-MAPK-Inhibitors SB-203580 unterdrückte in den isoliert perfundierten Rattenlungen, die der Stimulation durch LTA und PepG unterzogen wurden, die durch freie AA induzierte und sich in den Messwerten Δ PAP, Δ VP und Δ W sowie in der Menge der produzierten Eikosanoide widerspiegelnde Reaktion der Lunge sehr deutlich.

Zyklooxygenase-2-Inhibitoren

Die Verabreichung der selektiven Cox-2-Inhibitoren NS-398 (25 μ mol/l), SC-236 (10 μ mol/l) und DUP-697 (25 μ mol/l) 10 min vor der AA-Gabe unterdrückte den durch die AA bewirkten Anstieg der drei Parameter Δ PAP, Δ VP und Δ W bei mit LTA und PepG (20 μ g/ml + 20 μ g/ml) stimulierten Lungen deutlich und hochsignifikant (Abb. 22A-C, Tab. 7a Anhang). Bei jedem der Inhibitoren wurde der Anstieg der drei Messparameter fast vollständig gehemmt, wobei der Inhibitor DUP-697 jeweils die stärkste Wirkung aufwies. Im Vergleich zu einem Δ PAP von 13.26 ± 0.7 mmHg 5 min nach AA-Zugabe zum Perfusat bei den zuvor mit LTA und PepG "geprimten" Lungen lag der Δ PAP mit einem Wert von 2.76 ± 0.57 mmHg bei Verwendung des Inhibitors NS-398 und einem Wert von 1.50 ± 0.25 mmHg beziehungsweise 0.02 ± 0.02 mmHg bei Anwendung der Inhibitoren SC-236 beziehungsweise DUP-697 hochsignifikant niedriger, wobei die letzteren beiden auch hochsignifikant geringere Werte erzielten als der bei den Kontrolllungen gemessene Δ PAP von 3.88 ± 0.15 mmHg. Der AA-induzierte Anstieg des Δ VP konnte durch den Einsatz der Inhibitoren NS-398, SC-236 und DUP-697 signifikant unterdrückt werden auf Werte von 0.70 ± 0.18 mmHg, 0.36 ± 0.06 mmHg und 0.02 ± 0.02 mmHg gegenüber einem Wert von 1.82 ± 0.33 mmHg bei den Lungen mit "LTA und PepG-Priming" ohne Inhibitorzugabe. Die nach AA-Applikation auftretende Gewichtseinlagerung der mit LTA und PepG perfundierten Rattenlungen wurde durch die eingesetzten Cox-2-Inhibitoren fast vollständig gehemmt mit einem Δ W von 0.37 ± 0.12 g bei NS-398, 0.23 ± 0.06 g bei SC-236 und 0.10 ± 0.03 g bei DUP-697 im Gegensatz zu einem Wert von 11.77 ± 0.80 g bei der Lungenstimulation ohne Inhibitor.



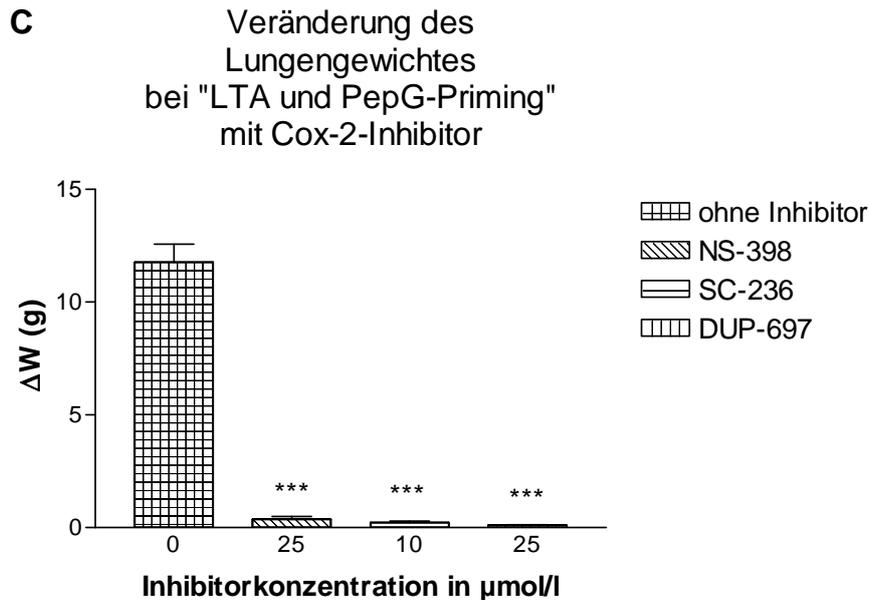
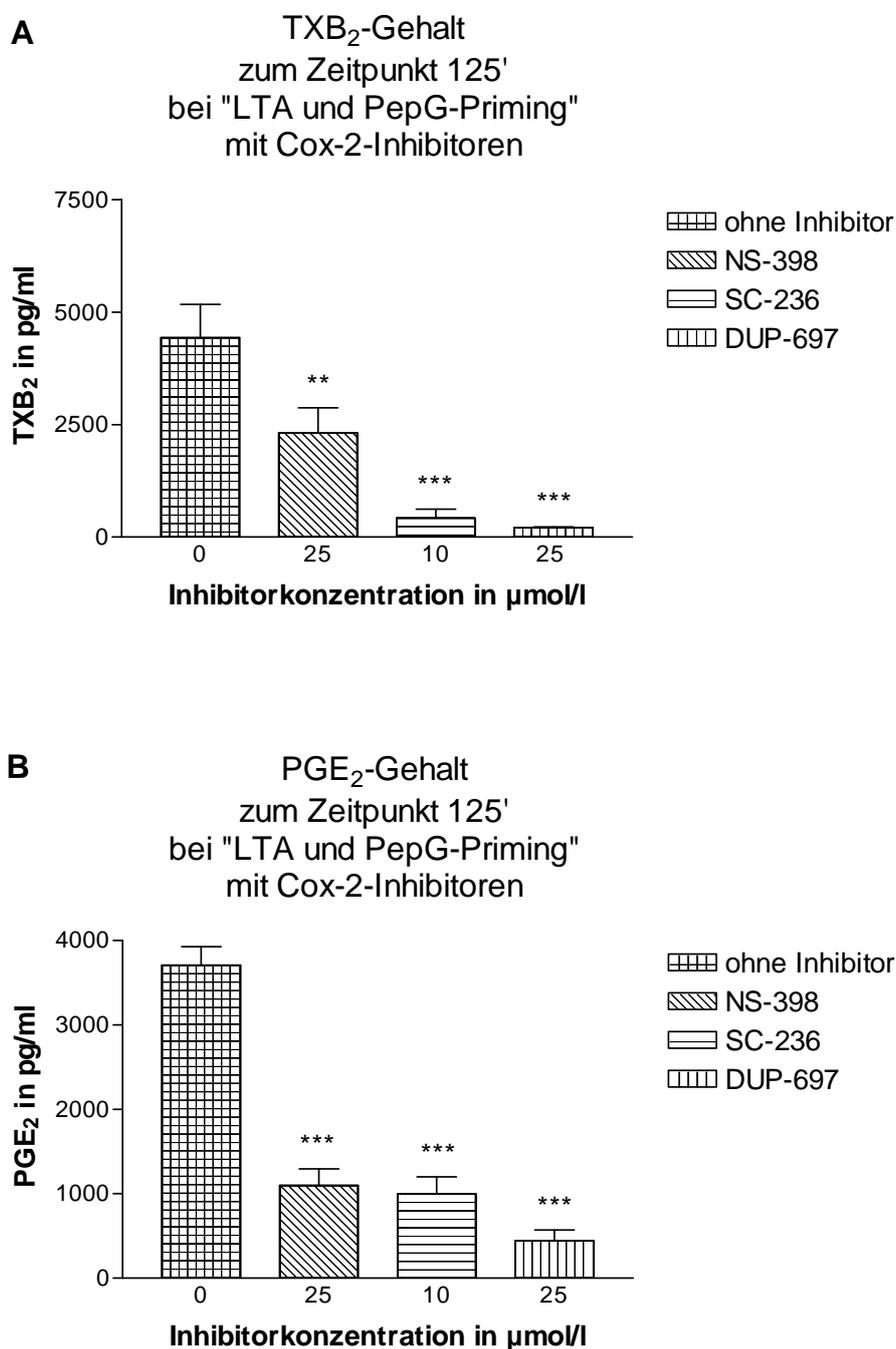


Abbildung 22A,B,C: Wirkung des "LTA und PepG-Primings" auf den AA-induzierten Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (ΔPAP), Ventilationsdruckes (ΔVP) und Lungengewichtes (ΔW) in Abwesenheit und Anwesenheit von Cox-2-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 $\mu\text{g/ml}$ LTA und 20 $\mu\text{g/ml}$ PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 $\mu\text{mol/l}$) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der Cox-2-Inhibitoren NS-398, SC-236 und DUP-697 erfolgte zum Zeitpunkt 110 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Perfusatanalyse: Parallel zu dem durch die Cox-2-Inhibitoren gehemmten Anstieg der Messwerte ΔPAP , ΔVP und ΔW nach AA-Stimulation wurde der Konzentrationsanstieg an AA-Metaboliten im Perfusat deutlich gehemmt (Abb. 23A-C, Tab. 7b Anhang). Während der TXB_2 -Gehalt bei den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden, 4431.0 ± 742.0 pg/ml betrug, wurde bei der Verwendung von NS-398 ein erniedrigter Wert von 2317.0 ± 398.8 pg/ml ermittelt. In den Versuchsgruppen mit SC-236 und DUP-697 lagen die TXB_2 -Konzentrationen bei 424.0 ± 677.0 pg/ml und 208.4 ± 18.0 pg/ml und damit deutlich unter den Werten der Vergleichslungen, denen LTA und PepG ohne Inhibitor verabreicht wurde, als auch unter den bei Kontrolllungen, die lediglich AA erhielten, gemessenen 2220.0 ± 543.1 pg/ml TXB_2 (Tab. 2e Anhang, Tab. 7b Anhang). Parallel dazu war die in dem Perfusat enthaltene Menge an PGE_2 bei Verabreichung der Inhibitoren NS-398 und SC-236 auf ungefähr ein Drittel, bei DUP-697 auf ungefähr ein Achtel des bei den Vergleichslungen ohne Inhibitor

ermittelten Wertes reduziert. Bei den Versuchen mit dem Cox-2-Inhibitor DUP-697 wurden auch deutlich niedrigere PGE₂-Konzentrationen als bei den ohne vorherigen grampositiven Stimulus mit AA versehenen Lungen festgestellt (Tab. 2e Anhang, Tab. 7b Anhang). Der 6-keto-PGF_{1α}-Gehalt war ebenfalls erniedrigt, bei NS-398 und SC-236 auf ungefähr die Hälfte der 6-keto-PGF_{1α}-Menge, die bei den mit LTA und PepG ohne Inhibitor "geprimten" Lungen gebildet wurde, bei DUP-697 auf ungefähr 20 % der bei den Vergleichslungen und 80 % der bei den Kontrolllungen bestimmten Werte (Tab. 2e Anhang, Tab. 7b Anhang).



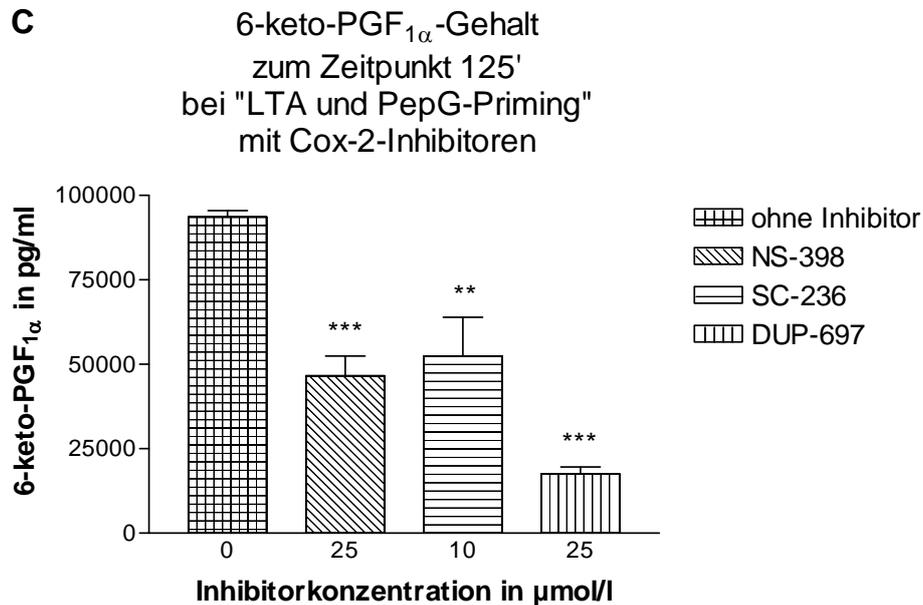


Abbildung 23A,B,C: Einfluss des "grampositiven Primings" auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} nach AA-Applikation in Abwesenheit und Anwesenheit von Cox-2-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 $\mu\text{g/ml}$ LTA und 20 $\mu\text{g/ml}$ PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 $\mu\text{mol/l}$) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der Cox-2-Inhibitoren NS-398, SC-236 und DUP-697 erfolgte zum Zeitpunkt 110 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM des Metabolitengehaltes im rezirkulierenden Perfusat in pg/ml zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: ** p<0.01, *** p<0.001.

Die drei in dieser Arbeit verwendeten Cox-2-Inhibitoren NS-398, SC-236 und DUP-697 hemmten signifikant sowohl die durch AA ausgelösten bronchialen und vaskulären Veränderungen in den mit grampositiven Bakterienwandbestandteilen stimulierten Rattenlungen als auch die im Perfusat gemessene Produktion an Eikosanoiden.

5. DISKUSSION

5.1 Kontrollversuche

Das Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Lunge des Kaninchens ist ein seit langem in der Arbeitsgruppe Seeger (1984, 1985, 1987, 1994) etabliertes und bewährtes Organmodell für die Erforschung der Lungenphysiologie und -pathophysiologie, ebenso wie das seit 1995 von L. Ermert in dieser Arbeitsgruppe eingerichtete Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge (Ermert et al., 1998a; 2000c, 2002). Zu den Charakteristika dieses Modells gehören ein konstanter pulmonalarterieller Druck und Ventilationsdruck innerhalb des physiologischen Messbereiches, ohne Anzeichen einer Ödembildung mit Gewichtserhöhung in der extrakorporal perfundierten und ventilerten Rattenlunge über die gesamte Dauer der stimulantienfreien Perfusion (Ermert et al., 1998b, 2000b), was auch bei den für diese Arbeit angefertigten Kontrollversuchen festgestellt werden konnte. Dabei zeigt die Lunge keine Veränderungen ihrer normalen histologischen Erscheinung. Wie bereits mehrfach beschrieben (Ermert et al., 1998a; Steudel et al., 1997), provoziert erst die Zugabe von freier AA in das Perfusionssystem eine Erhöhung der kontinuierlich registrierten Messwerte Δ PAP, Δ VP und Δ W, bei gleichzeitig durch ELISA-gestützte Methoden ermittelter, vermehrter Freisetzung der AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1 α} in das Perfusionsmedium. Es ist schon lange bekannt, dass dem intakten pulmonalen Gefäßsystem verabreichte freie AA zu einer Reihe von Eikosanoiden metabolisiert wird, allen voran TXA₂ und PGI₂ (Kramer et al., 1993; Seeger et al., 1982; Spannhake et al., 1978). Ermert et al. (1998a) zeigten, dass die durch AA in nicht stimulierten, nicht entzündeten Lungen durch die Thromboxanfreisetzung ausgelöste vasokonstriktorische Reaktion größtenteils über die Cox-2-Aktivität vermittelt wird, wobei die vasokonstriktorische Potenz von TXA₂ deutlich die gleichzeitig auftretende vasodilatatorische Wirkung von PGI₂ übertrifft. Parallel dazu konnte auch in morphologischen Studien die kontinuierliche Bildung von Cox-2 in Rattenlungen, die keine Anzeichen von Entzündung aufwiesen, festgestellt werden (Ermert et al., 1998b). Die typischerweise in dem Organmodell nach AA-Stimulation durch TXA₂ in der Rattenlunge ausgelöste Vasokonstriktion bewirkt eine Steigerung des kontinuierlich aufgezeichneten Druckes des pulmonalarteriellen (Δ PAP) und venösen (Δ LVP) Schenkels. Unter der Wirkung der

Eikosanoide kommt es zu einer passageren Permeabilitätserhöhung der Lunge, was sich durch eine Erhöhung des registrierten Lungengewichts ΔW zeigt. Diese in vorherigen Studien beobachteten Veränderungen in der Rattenlunge nach AA-Gabe (Ermert et al., 1998b, 2000b) zeigten sich auch bei den hier durchgeführten Kontrollversuchen.

5.2 “Priming“-Versuche

5.2.1 Untersuchungen zum “gramnegativen Priming“

Die ermittelten Ergebnisse zum “gramnegativem Priming“ stimmen überein mit vorherigen Studien (DeLong et al., 1999; Schütte et al., 1997; Steudel et al., 1997; Walmrath et al., 1994a) an mit LPS perfundierten Kaninchen- und Rattenlungen, bei denen ebenfalls bis zu dem Zeitpunkt der AA-Verabreichung keine Änderung der physiologischen Messwerte und nur eine geringe Produktion an Eikosanoiden festgestellt werden konnte. Die der AA-Applikation folgende, verstärkte vaso- und bronchokonstriktorische Reaktion der durch LPS “geprimten“ Lungen mit Gewichtszunahme wird der erhöhten TXA₂-Synthese zugeschrieben, die wiederum zurückgeführt werden kann auf die durch LPS induzierte, gleichzeitige Hochregulation der Cox-2 und der TX-Synthase während des LPS-“Primings“ (Ermert et al., 1998a, 2000a, 2000b, 2000c).

5.2.2 Untersuchungen zum “gramnegativen Priming“ mit Einsatz von verschiedenen Proteinkinase (PK)-Inhibitoren

Proteinkinase A-Inhibitor

Der Proteinkinase A-Inhibitor H-89 ist ein selektiver und potenter Inhibitor der PKA (K_i = 48 nM), der andere Kinasen erst ab höheren Konzentrationen (K_i = 28.3-38.3 µM) hemmt (de Rooij et al., 1998; Findik et al., 1995; Kawasaki et al., 1998).

Aufgrund der Versuchsergebnisse dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass die Proteinkinase A an der durch LPS ausgelösten Signaltransduktionskaskade mit vermehrter Eikosanoidbildung, nach Hochregulation der Cox-2, in der isolierten Rattenlunge nicht beteiligt ist.

In einer Studie von Caivano et al. (2000) dagegen konnte in leukämischen Mäusemakrophagen der Zelllinie RAW 264.7, die zuvor mit LPS stimuliert wurden, durch die Verabreichung von H-89 die durch Immunoblotting kontrollierte Transkription der Cox-2-Gene und die Induktion des Cox-2-Proteins verhindert werden. Hierbei wurde H-89 allerdings in Konzentrationen (10-50 μM) angewendet, bei welchen eine Spezifität alleinig für eine PKA-Interaktion nicht mehr gewährleistet war und nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch die Hemmung anderer Proteinkinasen eine Verhinderung der Cox-2-Transkription bewirkt wurde. Zudem konnte bei den Makrophagen die Aktivierung des an der Transkription von Cox-2 beteiligten Transkriptionsfaktors NF κ B nicht durch H-89 gehemmt werden (Caivano et al., 2000). In einer anderen Arbeit (Muroi und Suzuki, 1993) jedoch konnte der PKA-Inhibitor H-89 die Aktivierung von NF κ B in mit LPS behandelten Mäusemakrophagen der Zelllinie J774 hemmen. Auch in einer Studie von Chen et al. (1999b) konnte die durch LPS induzierbare NF κ B-Aktivierung durch den PKA-Inhibitor H-8 in RAW 264.7 Mäusemakrophagen gehemmt werden. Daneben konnte H-8 und ein weiterer PKA-Inhibitor (KT-5720) die Expression der iNOS und die Bildung von NO in dieser Zelllinie reduzieren. Diese *in vitro* Untersuchungen deuten im Gegensatz zu den Ergebnissen der eigenen Arbeit mit isolierten Rattenlungen auf eine Beteiligung der PKA an der durch LPS induzierten Signalweiterleitung hin.

Proteinkinase C-Inhibitoren

Die Aktivierung der PKC durch LPS konnte bereits in verschiedenen Studien an Makrophagen, Monozyten und Epithelzellen der Lunge nachgewiesen werden (Fujihara et al., 1994; He und Kogut, 2003; Lee et al., 2003; Lin et al., 1999; Liu et al., 1994; Serikov et al., 2004; Shapira et al., 1994).

Bisher ist jedoch noch nicht genau definiert worden, welche der 12 bekannten PKC-Isoenzyme an der durch LPS ausgelösten Signaltransduktion beteiligt sind.

Zur genaueren Untersuchung wurden daher in dieser Arbeit unterschiedliche PKC-Inhibitoren verwendet, die verschiedene Isoenzyme der PKC selektiv hemmen (Tab. 1). Dabei zeigten die eingesetzten PKC-Inhibitoren Gö 6976 (Hemmung von PKC α , β_I , μ), Myristoylierter PKC β_{C2-4} -Inhibitor (Hemmung von PKC α , β_I , β_{II} , γ), Ro-31-8425 (Hemmung von PKC α , β_I , β_{II} , γ , ϵ), Ro-32-0432 (Hemmung von PKC α , β_I , ϵ), Bisindolylmaleimid I (Hemmung von PKC α , β_I , β_{II} , γ , δ , ϵ) und Gö 6983 (Hemmung von PKC α , β_I , β_{II} , γ , δ , μ , ζ) in der aufgelisteten Reihenfolge eine signifikante, zunehmende Reduktion der durch "LPS-Priming" induzierten, erhöhten bronchialen und vasalen physiologischen Messwerte im Vergleich mit durch LPS stimulierten Rattenlungen.

Dagegen konnte insgesamt keine signifikante Hemmwirkung auf die Produktion der AA-Metabolite bei "LPS-geprimten" Rattenlungen unter dem Einsatz der PKC-Inhibitoren festgestellt werden. Die mit Ausnahme des Inhibitors Gö 6976 nicht signifikant, tendenziell vermindert, tendenziell vermehrt produzierten verschiedenen Eikosanoidmengen, die in der Rattenlunge nach Stimulation durch LPS unter dem Einsatz der einzelnen PKC-Inhibitoren in der vorliegenden Arbeit gemessen wurden, führen zu der Annahme, dass die Wirkung der PKC-Inhibitoren bei "gramnegativem Priming" eventuell nicht stringent über die Hemmung einer Aktivierung der MAPK ERK1/2 und p38-MAPK und somit der nachfolgenden Cox-2-Expression und Eikosanoidproduktion erfolgt, sondern dass auch andere metabolische Wege und vasoaktive Substanzen beeinflusst werden. Darunter z.B. der von der NOS gebildete endogene Vasodilatator NO. Neben einer Studie von Han et al. (2003) mit vaskulären glatten Muskelzellen bei denen unter Einsatz der PKC-Inhibitoren H7 und Chelerythrin eine Beteiligung der PKC an der durch LPS bewirkten NO-Bildung nachgewiesen werden konnte, belegen zahlreiche weitere Studien eine Beteiligung der PKC an der durch LPS ausgelösten Aktivierung der induzierbaren Stickstoffmonoxydsynthase iNOS (Chano und Descoteaux, 2002; Chen et al., 1998; Fujihara et al., 1994; Giroux und Descoteaux, 2000; St-Denis et al., 1998). Auch bei der durch LPS stimulierten Produktion von Endothelin, einem potenten Vasokonstriktor, soll die Proteinkinase C eine Rolle spielen, was die Ergebnisse einer

Studie mit Alveolarmakrophagen unter Einsatz der PKC-Inhibitoren Stauroporin und H7 belegen (Salh et al., 1998). Weiterhin könnten zusätzlich verschiedene PKC-Isoenzyme möglicherweise unterschiedliche "downstream"-Enzyme, wie die TX-Synthase, PGI-Synthase und PGE-Synthase steuern. Eine selektive Hemmung einzelner Synthesewege kann so zu unterschiedlich hoher Metabolitliberation führen. Eine Abnahme bestimmter Eikosanoide erklärt sich über eine Hemmung eines oder mehrerer PKC-Isoenzyme, die entsprechende "downstream"-Enzyme des AA-Metabolismus steuern. So können die eingesetzten PKC-Inhibitoren, die verschiedene PKC-Isoenzyme hemmen, eine Abnahme unterschiedlicher AA-Metabolite auslösen. Gleichzeitig ist eine Zunahme bestimmter Eikosanoide möglich, z.B. durch einen Wechsel der AA-Zwischenprodukte hin zu einem parallelen Abbauweg, wenn ein "downstream"-Enzym über eine übergeordnete PKC-Hemmung runterreguliert wurde obwohl mehr zu metabolisierende AA zur Verfügung stand. Diese vermehrt in der Zelle zur Verfügung stehende AA kann dann über andere Abbauwege weiter metabolisiert werden und es erfolgt eine Zunahme bestimmter anderer Metabolite. Sowohl die Ab- als auch die Zunahme bestimmter Eikosanoide sind abhängig davon welche Isoenzyme der PKC und welche AA-"downstream"-Enzyme wie z.B. die TX-Synthase, PGE-Synthase und PGI-Synthase in den für die pathophysiologisch messbaren Parameter verantwortlichen Zielzellen vorhanden sind. Ermert et al. (1998a, 2000a, 2000b) konnten z.B. in immunhistologischen Studien eine ähnliche Lokalisation und eine Hochregulation durch "LPS-Priming" für die Cox-2 und TX-Synthase in der Rattenlunge nachweisen. Bei einzelnen Inhibitoren kommt es zu einer verminderten Freisetzung des Vasokonstriktors TXB₂, lediglich bei Gö 6976 signifikant, bei Myristoyliertem PKC β_{C2-4} -Inhibitor und Bisindolylmaleimid I tendenziell, aber nicht signifikant, was den erniedrigten PAP bewirken kann. Auch die nicht signifikant tendenziell reduzierte Produktion des Vasokonstriktors PGE₂ unter dem Einsatz der Inhibitoren Bisindolylmaleimid I, Gö 6976 und Ro-32-0432 kann zu niedrigeren PAP-Werten führen. Die bei der Anwendung der Inhibitoren Myristoylierter PKC β_{C2-4} -Inhibitor und Bisindolylmaleimid I leicht und bei Gö 6983 und Ro-31-8425 deutlich erhöhten Mengen des Vasodilatators 6-keto-PGF_{1 α} können ebenfalls einen verringerten PAP verursachen. Demnach kann bei Gö 6983 und Ro-31-8425 die gesteigerte 6-keto-PGF_{1 α} -Konzentration und bei Ro-32-0432 die gesenkte PGE₂-Konzentration verantwortlich für den tiefer liegenden PAP sein. Bei dem Myristoylierten PKC β_{C2-4} -Inhibitor kann

die erniedrigte TXB₂-Konzentration zusammen mit der erhöhten 6-keto-PGF_{1α}-Konzentration, bei Gö 6976 die verminderte TXB₂- und PGE₂-Konzentration, bei Bisindolylmaleimid I die vermehrte 6-keto-PGF_{1α}-Konzentration gemeinsam mit der verringerten TXB₂- und PGE₂-Konzentration den niedrigeren PAP herbeiführen.

Da die in dieser Arbeit angewendeten PKC-Inhibitoren keine signifikanten Änderungen der Eikosanoidproduktion nach AA-Verabreichung bei den mit LPS perfundierten Rattenlungen erzielen konnten, jedoch eine signifikante Hemmung der physiologischen Messparameter Δ PAP, Δ VP und Δ W bewirkten, ist davon auszugehen, dass die PKC im "gramnegativen Priming" der isolierten Rattenlunge involviert ist, die Signaltransduktion hier jedoch nicht stringent über die Cox-2-Schiene verläuft.

Die signifikante Hemmung der Pathophysiologie schließt nicht die Beteiligung bestimmter Isoenzyme aus, sondern legt die Vermutung nahe, dass mehrere der durch die verwendeten Inhibitoren gehemmten PKC-Isoenzyme am "gramnegativen Priming" beteiligt sein könnten. Die These wird unterstützt durch die Studien verschiedener anderer Arbeitsgruppen, die sich mit der Aktivierung der PKC und einzelner Isoenzyme bei der Stimulierung von Zellkulturen mit LPS beschäftigt haben.

So lassen mehrere Arbeiten eine Beteiligung der PKC α an der durch LPS induzierten Signaltransduktionskaskade vermuten (Chano und Descoteaux, 2002; Chen et al., 1998; Giroux und Descoteaux, 2000; Lin et al., 1996; Nakajima et al., 2003; St-Denis et al., 1998). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass in RAW 264.7 Makrophagen die Überexpression einer dominant-negativen Mutante der PKC α die LPS-induzierte IL-1 α -, iNOS- und Cox-2-Expression mit nachfolgender PGE₂-Sekretion sowie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-IL6 hemmt (Chano und Descoteaux, 2002; Giroux und Descoteaux, 2000; St-Denis et al., 1998). Das spricht für eine regulierende Funktion der PKC α bei den durch LPS ausgelösten Makrophagenfunktionen im Rahmen einer Entzündungsreaktion. In einer weiteren Studie konnte durch Westernblot die Translokation von PKC α und auch PKC ϵ in Makrophagen, die durch LPS stimuliert wurden, nachgewiesen werden, was eine

Beteiligung dieser Isoenzyme an der durch LPS vermittelten Modulation der Makrophagen nahe legt (Lin et al., 1996). Bei der zur TNF α -Produktion führenden Signalkaskade in mit LPS stimulierten Mikrogliazellen ist PKC α durch den Einsatz des Inhibitors Gö 6976, als an der Signaltransduktion beteiligte PKC-Isoform von Nakajima et al. (2003) ermittelt worden. In einer Studie von Chen et al. (1998) unterdrückte die Anwendung des gleichen Inhibitors Gö 6976 die durch Stimulation mit LPS bewirkte Expression von iNOS und Freisetzung von NO in RAW 264.7 Makrophagen über eine Hemmung der PKC α und PKC β . Asehnoune et al. (2005) arbeiteten ebenfalls mit dem Inhibitor Gö 6976 und kamen aufgrund ihrer Versuchsergebnisse zu der Annahme, dass PKC α und PKC β die durch LPS ausgelöste NF κ B-abhängige Transkription in Neutrophilen regulieren. Somit wird auch der PKC β in verschiedenen Studien eine Beteiligung an der LPS-Signaltransduktion zugesprochen. Die unter Verwendung von immunhistochemischen Verfahren nachgewiesene, durch LPS induzierte Translokation der PKC β in Mäusemakrophagen bestätigt die Vermutung, dass die PKC β bei der LPS-Signalweiterleitung in Makrophagen eine entscheidende Rolle spielt (Shinji et al., 1994). Darüber hinaus haben Fujihara et al. (1994) in einer Untersuchung an J774 Mäusemakrophagen dargestellt, dass die PKC bei dem durch LPS getriggerten Signaltransduktionsweg, der zur Aktivierung der iNOS und NO-Produktion führt, eine wichtige Rolle spielt, wobei vor allem die PKC β_{II} involviert sein soll, während die Beteiligung weiterer Isoenzyme nicht ausgeschlossen werden kann. In Untersuchungen von Chen et al. (1998) mit RAW 264.7 Makrophagen zeigte die Behandlung mit blockierenden Oligonukleotiden, dass die PKC-Isoenzyme α , β_I und auch δ , nicht aber η an der Regulation der durch LPS ausgelösten Aktivierung von NF κ B, Expression von iNOS und Freisetzung von NO beteiligt sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen ebenfalls eine Beteiligung der Isoenzyme PKC α , β_I und β_{II} an der durch LPS ausgelösten Signalweiterleitung vermuten. In den mit isolierten Rattenlungen durchgeführten Versuchen haben alle eingesetzten PKC-Inhibitoren die nach AA-Verabreichung auftretenden physikalisch messbaren vasalen und bronchialen Reaktionen der durch LPS stimulierten Lungen reduziert. Die Isoenzyme PKC α und β_I wurden neben anderen Isoenzymen durch alle verwendeten PKC-Inhibitoren, das heißt durch Gö 6976, Myristoylierter PKC β_{C2-4} -Inhibitor, Ro-31-8425, Ro-32-0432, Bisindolylmaleimid I und Gö 6983

gehemmt. Durch die Inhibitoren Myristoylierter PKC β_{C2-4} -Inhibitor, Ro-31-8425, Bisindolylmaleimid I und Gö 6983 wurde auch das Isoenzym PKC β_{II} gehemmt.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I und Gö 6983 hemmen neben PKC α und β unter anderem auch das Isoenzym PKC δ , für welches neben der oben erwähnten Studie von Chen et al. (1998) auch von Kontny et al. (2000) eine Beteiligung an der durch LPS ausgelösten Signalkaskade nachgewiesen werden konnte. Kontny et al. (2000) stellten fest, dass LPS in humanen Monozyten eine Translokation von PKC α und δ vom Zytosol zur Membran auslöst. Die Anwendung des diese Isoenzyme hemmenden PKC-Inhibitors Rottlerin konnte diese Translokationen und die nachfolgende Produktion der untersuchten Zytokine TNF α und IL-1 β verhindern (Kontny et al., 2000). Somit scheint diesem Isoenzym, wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, eine Rolle bei der Signalweiterleitung von LPS zuzukommen.

Auch die Aktivierung von PKC ϵ wird in einer Reihe von Studien (Castrillo et al., 2001; Comalada et al., 2003; Lin et al., 1996; Shapira et al., 1997; Valledor et al., 2000) als ein entscheidender Schritt in der Signalantwort von Makrophagen auf LPS bezeichnet. Lin et al. (1996) und Valledor et al. (2000) haben bei ihren Untersuchungen eine durch LPS ausgelöste Aktivierung und Translokation des Isoenzym PKC ϵ vom Zytosol zur Membran nachweisen können, was ebenso für eine Beteiligung dieser Isoform spricht, wie die Aufhebung der durch LPS-Stimulation in Makrophagen bewirkten erhöhten PKC-Aktivität durch Verwendung eines isoformspezifisch gegen PKC ϵ gerichteten Antikörpers (Shapira et al., 1997). Darüber hinaus wurde in Knochenmarksmakrophagen die durch LPS induzierte, vorübergehende Expression der MAPK-Phosphatase-1 durch den Einsatz eines zur PKC ϵ -spezifischen mRNA gegensinnigen Oligonukleotids gehemmt (Valledor et al., 2000). Bei dieser Studie erzielte auch nur der Inhibitor Bisindolylmaleimid I, der neben den konventionellen PKCs auch die PKC ϵ hemmt, eine Veränderung der MAPK-Phosphatase-1 Induktion, nicht jedoch der lediglich die Isoenzyme PKC α und β_I hemmende Inhibitor Gö 6976 (Valledor et al., 2000). In einer weiteren Studie konnte die Beteiligung der PKC ϵ an der durch LPS ausgelösten Signalantwort bei Mäusen und für deren isolierte Makrophagen gezeigt werden (Castrillo et al., 2001). Für PKC ϵ -defiziente Mäuse ergab sich nach intravenöser Verabreichung von

grampositiven und gramnegativen Bakterien eine stark reduzierte Überlebenszeit. Die Makrophagen von PKC ϵ -defizienten Mäusen zeigten eine abgeschwächte Antwort auf LPS, charakterisiert durch deutliche Reduktion der Bildung von NO, TNF α und IL-1 β . Die durch LPS induzierte Translokation von NF κ B und Induktion der NOS-2 war dabei ernsthaft gestört. Auch die Aktivierung der ERK und p38-MAPK erfolgte in einem geringeren Ausmaß, was eine entscheidende Rolle der PKC ϵ "upstream" der Phosphorylierungen, die diese Kinasen aktivieren, vermuten lässt. In Übereinstimmung mit dieser These konnte auch in Kardiomyozyten von Kaninchen die PKC ϵ -vermittelte Aktivierung des MAPK-Weges, welche zur zellulären Translokation von NF κ B führte, gezeigt werden (Li et al., 2000). Unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren und PKC ϵ -defizienten Mäusen konnte für PKC ϵ auch eine Beteiligung an der Aktivierung der MAPK JNK nachgewiesen werden, welche über TNF α -Sekretion die durch LPS verursachte Apoptose von Makrophagen vermittelt (Comalada et al., 2003). In anderen Studien (Aksoy et al., 2002, 2004) wurde festgestellt, dass eine PKC-Hemmung durch Bisindolylmaleimid I (Hemmung von PKC α , β _I, β _{II}, γ , δ , ϵ) die durch LPS hervorgerufene NF κ B-Aktivierung in humanen dendritischen Zellen verhindern kann und die Produktion von IL-12 verringert. Darüber hinaus konnten Pseudosubstrate für PKC ϵ , nicht aber solche für PKC α oder PKC β die Produktion von IL-12 und TNF α in diesen Zellen nach LPS-Stimulation vermindern. Diese Daten unterstützen die These, dass PKC ϵ eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen als Antwort auf LPS spielt.

Auf eine Beteiligung des Isoenzym PKC ϵ bei der durch LPS ausgelösten Signaltransduktionskaskade weisen auch die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen hin. Der Einsatz der neben anderen Isoenzymen auch das Isoenzym PKC ϵ hemmenden Inhibitoren Ro-31-8425, Ro-32-0432 und Bisindolylmaleimid I bewirkte eine deutliche Hemmung der durch LPS in isolierten Rattenlungen hervorgerufenen Erhöhungen von pulmonalarteriellem Druck, Ventilationsdruck und Lungengewicht.

Bei anderen Untersuchungen wird der PKC-Isoform ζ eine entscheidende Rolle bei der durch LPS ausgelösten Signaltransduktionskaskade zugewiesen (Castrillo et al., 2003; Mestre et al., 2001; Monick et al., 1999, 2000). LPS aktiviert in RAW 264.7

Makrophagen vorübergehend die PKC ζ und JNK, nachgewiesen durch Westernblot (Castrillo et al., 2003). Bei mit Endotoxin behandelten Makrophagen vermittelt laut Mestre et al. (2001) neben den MAPK auch die PKC ζ durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B, NF-IL6 und CRE eine Hochregulation der Cox-2-Expression. Nach Monick et al. (1999, 2000) ist die Aktivierung der PKC ζ mit nachfolgender Aktivierung der ERK beteiligt an der durch LPS hervorgerufenen und als entscheidender Schritt bei der Entstehung von ARDS bezeichneten Zytokinfreisetzung humaner Alveolarmakrophagen. Cuschieri et al. (2004) kamen durch ihre Untersuchungen, unter Verwendung des PKC-Inhibitors Gö 6983, zu der Schlussfolgerung, dass die PKC ζ essentiell für die LPS-induzierte Makrophagenaktivierung ist.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Anwendung des Inhibitors Gö 6983 eine deutliche Reduktion der durch LPS ausgelösten pulmonalen Reaktivität in Versuchen mit isolierten Rattenlungen erzielen. Der Inhibitor Gö 6983 hemmt neben der PKC ζ auch die Isoenzyme PKC α , β _I, β _{II}, γ , δ und μ . Somit ist aufgrund der eigenen Ergebnisse eine Beteiligung der PKC ζ an der durch LPS induzierten Signaltransduktionskaskade anzunehmen, zusätzlich besteht jedoch die Möglichkeit, dass auch die anderen durch diesen Inhibitor gehemmten Isoenzyme eine Rolle spielen.

Wie der Inhibitor Gö 6983 hemmt auch der Inhibitor Gö 6976 in der bei der vorliegenden Studie angewendeten Konzentration neben weiteren Isoenzymen zusätzlich die PKC μ . Da beide Inhibitoren in der Lage waren, die durch LPS bewirkten pulmonalen Veränderungen in der Rattenlunge zu reduzieren, ist auch eine Beteiligung dieses Isoenzym bei der durch LPS ausgelösten Signaltransduktion möglich.

Die in der vorliegenden Untersuchung eingesetzten Inhibitoren Myristoylierter PKC β _{C2-4}-Inhibitor, Ro-31-8425, Bisindolylmaleimid I und Gö 6983 hemmen neben anderen Isoenzymen auch die PKC γ . Die von diesen Inhibitoren erzielte Hemmung der "Priming"-Reaktion geben damit einen Hinweis auf die mögliche Beteiligung auch des Isoenzym PKC γ an der intrazellulären Signalweiterleitung des Endotoxins LPS.

Alle genannten Isoenzyme könnten demnach an der LPS-Signaltransduktionskaskade in isolierten Rattenlungen beteiligt sein. Insgesamt lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Thesen anderer Arbeitsgruppen vermuten, dass verschiedene Isoenzyme der PKC an der durch LPS ausgelösten Signalkaskade mit Auslösung von Entzündung in der Lunge, welche zu ARDS führen kann, beteiligt sind. Dies unterstützt die Ansicht, dass die Hemmung der PKC ein interessantes Ziel zur therapeutischen Intervention darstellt, um die LPS-induzierten Veränderungen der Vaso- und Bronchoreaktivität während septischer Lungenkrankheiten zu blockieren, wobei noch näher untersucht werden muss, ob einzelne Isoenzyme eine größere Rolle spielen als andere.

5.2.3 Untersuchungen zum “grampositiven Priming“

Das vorliegende Ergebnis der Untersuchung mit alleiniger und kombinierter Verabreichung von LTA und PepG geht konform mit einer Studie von De Kimpe et al. (1995), wonach ebenfalls für LTA und PepG eine synergistische Wirkung bei der Freisetzung von Zytokinen wie TNF α und Interferon- γ zur Aktivierung der iNOS und zur Auslösung von Schock und Multiorganversagen bei Ratten festgestellt werden konnte. In dieser Studie konnten PepG und LTA bei alleiniger Gabe nicht die gleichen Effekte auslösen wie bei einer kombinierten Gabe, selbst bei einer dreifach höheren Dosierung von LTA. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch *in vitro* Studien dieser Arbeitsgruppe (De Kimpe et al., 1995), bei denen PepG alleine nicht die Freisetzung von NO durch iNOS in Makrophagen bewirken konnte, aber die durch LTA ausgelöste Freisetzung potenzierte. Kengatharan et al. (1998) nehmen an, dass ein spezifisches Fragment von PepG, MDP, offenbar verantwortlich ist für die Interaktion des PepG-Polymers mit LTA bei der Auslösung eines Schocks und des nachfolgenden Multiorganversagens bei der Ratte. Die Autoren postulierten, dass die Struktur von LTA die Pathogenität eines speziellen Bakteriums bestimmt, während PepG dafür verantwortlich ist, die durch LTA ausgelösten Reaktionen zu verstärken. Auch bei Untersuchungen am Schwein *in vivo* (Middelveld, 2000) ergab sich eine synergistische Wirkung von PepG und LTA bei der Auslösung respiratorischen Versagens und septischen Schocks, mit wiederum geringerer Wirkung von PepG als von LTA bei ihrer alleinigen Gabe und deutlich verstärkter Wirkung bei kombinierter

Gabe. Card et al. (1994) vermuten, dass LTA und LPS ähnliche Aktionsmechanismen bei der Zellaktivierung haben, da eine Crosstoleranz zwischen LPS und LTA bei Makrophagen nachgewiesen werden konnte und LTA, ähnlich wie LPS, die Freisetzung von PGE₂ bei Makrophagen auslösen konnte.

Neuere Studien konnten auch eine synergistische Wirkung beziehungsweise eine gegenseitiges "Priming" für LPS und PepG *in vitro* und *in vivo* nachweisen (Hadley et al., 2005; Matsuda et al., 2008; Murch et al., 2007; Ruud et al., 2007). Bei Untersuchungen mit männlichen Ratten wurde eine deutliche Zunahme der Lungenschädigung, Zytokinfreisetzung und Organdysfunktion bei gleichzeitiger oder 24 Stunden zeitversetzter intravenöser Injektion von LPS und MDP, dem kleinsten pathogenen Bestandteil von PepG, gegenüber alleiniger LPS-Verabreichung nachgewiesen werden (Murch et al., 2007).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die grampositiven Bakterienwandbestandteile LTA und PepG bei kombinierter Gabe in der Lage sind, eine ähnliche "Priming"-Reaktion in der Rattenlunge auszulösen wie der gramnegative Bakterienwandbestandteil LPS bei ähnlichen Wirkmechanismen. Die kombinierte Verabreichung von LTA und PepG in der extrakorporal ventilierten und perfundierten Rattenlunge ist ein geeignetes Versuchsmodell, um die möglichen intrazellulären Signaltransduktionswege und zellulären Effektorsysteme, etwa nach Infektion mit grampositiven Bakterien, durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren näher zu betrachten.

5.2.4 Untersuchungen zum "grampositiven Priming" mit Einsatz von verschiedenen Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion sowie Zyklooxygenase (Cox)-2-Inhibitoren

Proteinkinase C-Inhibitoren

Lin et al. (2001, 2002) konnten zeigen, dass bei der Stimulation der menschlichen Lungenepithelzellen A549 mit LTA die Proteinkinase C aktiviert wird und dass dies nötig ist für die weitere Signaltransduktion über die MAPK ERK1/2 und p38-MAPK,

welche eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB bewirkten, was schließlich zur gesteigerten Cox-2-Expression und Freisetzung von PGE₂ führte. Die Verwendung des PKC-Inhibitors Gö 6976 bewirkte eine reduzierte Bildung von PKC, ERK1/2, p38-MAPK, NFκB und Cox-2.

Auch in Untersuchungen mit RAW 264.7 Mäusemakrophagen konnte für LTA eine Aktivierung der Proteinkinase C und von NFκB nachgewiesen werden, was zur Cox-2-Expression (Chiang et al., 2003) sowie zur iNOS-Expression und NO-Freisetzung (Kuo et al., 2003) bei diesen Zellen führte. Der Einsatz des PKC-Inhibitors Gö 6976 (Chiang et al., 2003; Kuo et al., 2003) schwächte die festgestellten Reaktionen in den Zellen deutlich und bestätigt daher für die Proteinkinase C auch in diesen Zellen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion nach LTA-Stimulation.

Die Ergebnisse dieser Studien (Chiang et al., 2003; Kuo et al., 2003; Lin et al., 2001, 2002) stimmen mit den eigenen Untersuchungen überein, die auf eine Beteiligung der PKC an der durch "grampositives Priming" ausgelösten intrazellulären Signaltransduktion schließen lassen, da die messbaren physiologischen vasalen und bronchialen Veränderungen in den mit LTA und PepG stimulierten isolierten Rattenlungen unter dem Einsatz von Bisindolylmaleimid I, Gö 6976 und Gö 6983 signifikant gehemmt wurden.

Die dabei ermittelten, teilweise erniedrigten, teilweise erhöhten Konzentrationen an TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} im Perfusat führen zu der Annahme, dass verschiedene PKC-Isoenzyme möglicherweise unterschiedliche "downstream"-Enzyme steuern und in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation in den Lungenzellen über eine Hemmung einzelner Synthesewege zu unterschiedlich hoher Metabolitliberation führen können, wie bereits beim Einsatz von PKC-Inhibitoren bei "gramnegativem Priming" diskutiert. Darüber hinaus kann die Wirkung der PKC-Inhibitoren bei "grampositivem Priming" möglicherweise auch nicht stringent über die Hemmung einer Aktivierung der MAPK ERK1/2 und p38-MAPK und somit der nachfolgenden Cox-2-Expression und Eikosanoidproduktion erfolgen. Vielmehr scheinen die PKC-Isoenzyme im Wesentlichen anderen konkurrierenden vasoaktiven Systemen vorgeschaltet zu sein, wie der Produktion von Vasokonstriktoren, z.B. Endothelin

oder auch der iNOS mit nachfolgender Produktion des Vasodilatators NO, was auch von Kuo et al. (2003) bei Mäusemakrophagen festgestellt werden konnte. Die gemessenen Eikosanoidspiegel könnten dabei als Ausdruck vielfältiger Gegenregulationsmechanismen aufgefasst werden.

Zur näheren Differenzierung, welche der 12 PKC-Isoenzyme an der "grampositiven Priming"-Reaktion beteiligt sind, wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Inhibitoren verwendet, Bisindolylmaleimid I, Gö 6976 und Gö 6983. Da alle drei eingesetzten Inhibitoren in den hier durchgeführten Versuchen eine Hemmwirkung auf die pulmonale Reaktivität der mit LTA und PepG stimulierten Rattenlunge zeigten, ist die Beteiligung aller von diesen Inhibitoren gehemmten Isoenzyme möglich, ohne eines der Isoenzyme ausschließen zu können. Da die Inhibitoren Gö 6976 und Gö 6983 stärker die überschießende Reaktion der Lunge auf die AA-Gabe hemmten als Bisindolylmaleimid I, könnte vor allem der PKC μ eine wichtige Rolle zukommen. Ebenso könnte die Isoform PKC ζ entscheidend beteiligt sein, da diese nur von dem Inhibitor Gö 6983 gehemmt wird, bei dessen Einsatz die durch "Priming" ausgelösten bronchialen und vasalen Reaktionen in der Lunge am stärksten gehemmt wurden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gehen konform mit den beschriebenen Resultaten der genannten *in vitro* Studien (Chiang et al., 2003; Kuo et al., 2003; Lin et al., 2001, 2002), bei denen ebenfalls der Inhibitor Gö 6976 erfolgreich eingesetzt wurde und lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Kontrolle der Aktivität von PKC-Isoenzymen eine effiziente Strategie zur Verhinderung oder Therapie von inflammatorischen Veränderungen in der durch grampositive Bakterien belasteten Lunge, darstellen könnte. Zur näheren Bestimmung, welche Isoenzyme der PKC bei dem "grampositiven Priming" der Lunge beteiligt sind, werden jedoch noch weitere Untersuchungen nötig sein.

Mitogen aktivierte Proteinkinase-Inhibitoren

Der ERK1/2-Inhibitor UO126 ist ein nichtkompetitiver Inhibitor für die beiden Substrate ATP und ERK der Mitogen aktivierten Proteinkinasekinase (MEK) 1 und 2 (DeSilva et al., 1998; Duncia et al., 1998; Favata et al., 1998). SB-203580 hemmt kompetitiv zu ATP (Young et al., 1997) die p38-MAPK. Vorherige Studien haben die

Spezifität des Inhibitors bewiesen (Cuenda et al., 1995; Kumar et al., 1999; Lee et al., 2000).

Die MAPK ERK1/2, die auch als p42/44-MAPK bezeichnet wird, und die p38-MAPK gehören mit der JNK zu der Gruppe der drei Haupt-MAPK-Familien, für die bereits eine Beteiligung an der durch LPS ausgelösten Signaltransduktion nachgewiesen werden konnte (Carter et al., 1999; Chen und Lin, 2001; Mancuso et al., 2002; Matsuguchi et al., 2001; Shen et al., 2007). Die Aktivierung der p38-MAPK ist der letzte Schritt in einer Kaskade von intrazellulären Signaltransduktionsenzymen, die möglicherweise bei der Regulierung und Bildung zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren wie TNF, IL-1 und IL-6 (Laporte et al., 2000; Ono und Han, 2000) und induzierbarer Enzyme wie der Cox-2 oder iNOS (Chen et al., 1999a; Ermert et al., 2002; Guan et al., 1998; Newton et al., 2000; Shen et al., 2007) beteiligt ist, was eine wichtige Rolle bei der Pathogenese inflammatorischer Lungenkrankheiten wie ARDS spielt.

In einer Studie von Ermert et al. (2003) unterdrückte der Inhibitor SB-203580 in mit LPS perfundierten isolierten Rattenlungen die durch AA über die Cox-2/TX-Synthase-Schiene ausgelöste Vasokonstriktion, Bronchokonstriktion und Lungenödembildung. Parallel dazu konnten verminderte TXB₂-, nicht aber PGI₂-Mengen im Perfusat nachgewiesen werden (Ermert et al., 2003). Mit immunhistochemischen Techniken in Kombination mit quantitativer Mikrodensitometrie konnten Ermert et al. (2003) die p38-MAPK in nahezu allen Zelltypen von Kontrolllungen ermitteln, während die aktivierte Form der p38-MAPK nur in speziellen Zelltypen, wie den bronchialen Epithelzellen, Endothelzellen, Alveolarmakrophagen und vaskulären glatten Muskelzellen kleiner Gefäße vorlag. Durch Endotoxin-Stimulation wurde die Expression der aktiven p38-MAPK-Form in den meisten Zellen, darunter auch denen der kleinen Gefäße gesteigert und zusätzlich in Septumzellen, bronchialen glatten Muskelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen größerer pulmonaler Gefäße beobachtet. Die festgestellte Immunlokalisation der p38-MAPK-Aktivität in mit LPS stimulierten Lungen und die durch Einsatz von SB-203580 erreichte pharmakologische Intervention lassen eine entscheidende Rolle der p38-MAPK bei der Hochregulation der LPS-vermittelten Signalkaskade mit Auslösung einer Cox-2- und TX-Synthase-abhängigen gesteigerten bronchialen und vaskulären

Reaktion mit Ödembildung der Lunge vermuten. Diese These geht konform mit Studien an Zelllinien von Makrophagen, die bereits eine entscheidende Rolle der p38-MAPK (Chen et al., 1999a; Hwang et al., 1997) und auch der ERK1/2 (Hwang et al., 1997) bei der Cox-2-Expression nach LPS-Verabreichung vermuten ließen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bei Verabreichung der Inhibitoren SB-203580 oder UO126 lassen auch hier die Vermutung zu, dass die p38-MAPK und ERK1/2 an der, auf einer Hochregulation der Cox-2 und TX-Synthase basierenden "Priming"-Reaktion, entscheidend beteiligt sind. Die Hemmung der p38-MAPK wie auch der ERK1/2 führte zu einer verminderten pulmonalarteriellen und bronchialen Reaktion sowie verringerter Ödembildung der Lunge nach Stimulation durch die grampositiven Bakterientoxine LTA und PepG.

Diese Ansicht stimmt überein mit einer Studie von Lin et al. (2002), in der durch Einsatz des p38-MAPK-Inhibitors SB-203580 und verschiedener ERK1/2-Inhibitoren eine Abschwächung der durch LTA induzierten Steigerung der Cox-Aktivität und Cox-2-Expression in humanen Lungenepithelzellen A549 nachgewiesen werden konnte. SB-203580 und diverse ERK1/2-Inhibitoren hemmten auch die Bildung eines NFκB-spezifischen DNA-Proteinkomplexes, was die Schlussfolgerung zulässt, dass in A549-Zellen die Aktivierung der p38-MAPK durch LTA in der Stimulierung einer NFκB-spezifischen DNA-Proteinbindung mit nachfolgender Cox-2-Expression resultiert. Darüber hinaus lassen Untersuchungen mit Einsatz des Inhibitors SB-203580 bei Mäusemakrophagen RAW 264.7 eine Beteiligung der p38-MAPK an der durch LTA ausgelösten NFκB-Aktivierung mit nachfolgender iNOs-Expression und NO-Freisetzung vermuten (Kao et al., 2005). Auch Schröder et al. (2001) zeigten, dass LTA von *Treponema*-Spezies, ähnlich wie LPS, in der Lage ist, in isolierten Zellen die MAPK ERK1/2, JNK und p38-MAPK zu aktivieren. Parallel dazu aktivierte der grampositive Bakterienwandbestandteil PepG in einer Studie von Dziarski et al. (1996) bei Mäusemakrophagen RAW 264.7 stark die ERK1/2 und schwach die p38-MAPK, was auf ähnliche Wege der Signaltransduktion von LPS und PepG schließen lässt; ebenso wie die durch den Einsatz von Inhibitoren der ERK1/2 und p38-MAPK erzielte abgeschwächte PepG-induzierte IL-8-Expression bei menschlichen Lungenepithelzellen A549 (Cheon et al., 2008).

Diese Ergebnisse gehen konform mit der vorliegenden Arbeit, worin durch den Einsatz der Inhibitoren UO126 und SB-203580 die Vaso- und Bronchokonstriktion sowie Lungenödembildung infolge des "LTA und PepG-Primings" verhindert werden konnte. Insgesamt scheint bei der "Priming"-Reaktion der isolierten Rattenlunge auch durch die grampositiven Bakterienwandbestandteile LTA und PepG eine entscheidende Beteiligung der MAPK ERK1/2 und p38-MAPK an der Hochregulation der Cox-2 und TX-Synthase vorzuliegen. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die Hemmung der MAPK ERK1/2 und p38-MAPK eine interessante neue therapeutische Strategie darstellt, um die durch grampositive Bakterien induzierten Veränderungen der bronchialen und vasalen Reaktivität während septischer Lungenkrankheiten zu unterdrücken.

Zyklooxygenase-2-Inhibitoren

Die verschiedenen verwendeten Cox-2-Inhibitoren gehören zu einer Gruppe nichtsteroidaler Antiphlogistika (NSAID), die *via* Cox-2 unter anderem eine Hemmung der Prostaglandinsynthese als therapeutischen Effekt erzielen, wobei in den verwendeten Dosierungen die Cox-2 selektiv inhibiert wird ohne die Cox-1 zu beeinflussen (Copeland et al., 1994; Futaki et al., 1994; Masferrer et al., 1994).

Die Beteiligung der Cox-2 an der "Priming"-Reaktion durch den gramnegativen Bakterienwandbestandteil LPS konnte bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Ermert et al., 1998a, 2000b, 2000c). Dabei ist auch die Lokalisation der verschiedenen Cox und der TX-Synthase von Bedeutung. Während die Cox-1 sich hauptsächlich in bronchialen Epithelzellen und alveolären Makrophagen befindet, konnte die Cox-2 in immunhistologischen Studien überwiegend in den vaskulären glatten Muskelzellen der partiell muskulären Gefäße und in Makrophagen-ähnlichen Zellen im peribronchialen und perivaskulären Bindegewebe nachgewiesen werden (Ermert et al., 1998b). Korrespondierend dazu konnte gezeigt werden, dass sich auch die TX-Synthase hauptsächlich in den vaskulären und bronchialen glatten Muskelzellen der normalen Rattenlunge (Ermert et al., 2000a) befindet. In mit LPS "geprimten" Lungen konnte immunhistologisch eine Hochregulation beider Enzyme, der Cox-2 und der TX-Synthase, festgestellt werden,

während die Cox-1-Aktivität unverändert blieb (Ermert et al., 2000b, 2000c). Der Einsatz dieser auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Cox-2-Inhibitoren, erzielte bei mit LPS "geprimten" und im Folgenden ebenfalls mit AA stimulierten Rattenlungen eine deutliche Hemmung der sonst gesteigerten Vasokonstriktion, Bronchokonstriktion und Ödembildung in der Rattenlunge als Reaktion auf den sekundären Stimulus AA (Ermert et al., 2000c).

Den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen zufolge scheint auch bei den durch grampositive Bakterienwandbestandteile stimulierten Rattenlungen die gemeinsame Induktion der Cox-2 und der TX-Synthase das entscheidende Ereignis zu sein, welches für die gesteigerte pulmonale Bereitschaft auf einen sekundären Stimulus wie AA zu reagieren verantwortlich ist.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen stellten Lin et al. (2001, 2002) für menschliche Lungenepithelzellen eine Beteiligung der Cox-2 an dem Signaltransduktionsweg von LTA fest. Darüber hinaus lassen Untersuchungen bei Mäusemakrophagen RAW 264.7 mit Einsatz des Inhibitors NS-398 vermuten, dass die Cox-2 an der durch LTA ausgelösten Aktivierung des NFκB sowie der iNOs-Expression und NO-Bildung (Chang et al., 2006) ebenso beteiligt ist wie an der durch PepG induzierten NFκB-Aktivierung und IL-6-Produktion (Chen et al., 2006).

Diese Erkenntnisse können hilfreich sein für die weitere Medikamentenentwicklung zur Verhinderung überschießender inflammatorischer Reaktionen bei septischen Lungenerkrankungen mit grampositiver Beteiligung.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die durch gramnegative und in den letzten Jahren gehäuft auch durch grampositive Bakterien verursachte Sepsis führt häufig zur Auslösung des lebensbedrohlichen Krankheitsbildes ARDS. Beim ARDS kommt es durch eine überschießende inflammatorische Reaktion der Lunge zu schweren Störungen der pulmonalen Vasomotion und Ventilation sowie Schädigung der alveolokapillären Schranke mit Permeabilitätsstörung des Kapillarendothels und Ausbildung eines interstitiellen bzw. intraalveolären Lungenödems mit häufig letalen Folgen. Die genauen Mechanismen, die diese Schädigung der Lunge auslösen, sind noch nicht ganz aufgeklärt.

Um diese komplexen, pathogenetischen Vorgänge während der exsudativen Phase des ARDS näher zu untersuchen, werden von Forschern seit Langem isoliert perfundierte Lungen als Modellsysteme genutzt. Das in dieser Arbeit angewandte Modell der isolierten, blutfrei perfundierten und ventilerten Rattenlunge bietet die Möglichkeit der Versuchsdurchführung an einem intakten Organ mit funktionierenden physiologischen Regulationsmechanismen, die unmittelbar messtechnisch erfasst und ausgewertet werden können.

Der gramnegative Bakterienwandbestandteil Lipopolysaccharid löst in isolierten Lungen nach Verabreichung eines zweiten inflammatorischen Stimulus, wie Arachidonsäure, eine als "Priming"-Effekt bezeichnete gesteigerte vasale und bronchiale Reaktivität mit erhöhter kapillarer und alveolärer Permeabilität der Lunge aus, die den pathophysiologischen Vorgängen und klinischen Symptomen des ARDS ähnelt. Es ist bekannt, dass dieser "Priming"-Reaktion eine durch LPS induzierte Signaltransduktionskaskade zugrunde liegt mit Beteiligung der MAPK p38-MAPK und ERK1/2, welche beide über die Aktivierung des NFκB-Komplexes eine Hochregulation der Cox-2 auslösen. Gleichzeitig kommt es zu einer gesteigerten Expression der TX-Synthase in den glatten vaskulären und bronchialen Muskelzellen und in der Folge zu einer vermehrten Bildung von Eikosanoiden.

Inwieweit dabei die Proteinkinase A und Proteinkinase C-Isoenzyme bei der intrazellulären Signaltransduktion des "gramnegativen Primings" beteiligt sind, wurde in dieser Arbeit unter Anwendung der Zellwandkomponente LPS von *Salmonella*

enterica Serovar *Abortusequi*, des PKA-Inhibitors H-89 und der PKC-Inhibitoren Gö 6976, Myristoylierter PKC β_{C2-4} -Inhibitor, Ro-31-8425, Ro-32-0432, Bisindolylmaleimid I und Gö 6983 untersucht.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Prüfung der Hypothese, dass die grampositiven Bakterienwandbestandteile Lipoteichonsäure und Peptidoglycan eine dem "Endotoxin-Priming" vergleichbare Reaktion auszulösen vermögen, durch Aktivierung ähnlicher Signaltransduktionskaskaden und zellspezifischer Effektorsysteme wie LPS. Dazu wurde die Stimulation der Rattenlungen durch LTA und PepG von *Staphylococcus aureus* untersucht und die Inhibitoren der PKC Bisindolylmaleimid I, Gö 6976 und Gö 6983, die Inhibitoren der MAPK ERK1/2 und p38-MAPK UO126 und SB-203580 sowie die Inhibitoren der Cox-2 NS-398, SC-236 und DUP-697 eingesetzt, um die pulmonale Reaktivität zu hemmen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die PKA nicht an der durch LPS ausgelösten Signaltransduktion beteiligt ist, da der Inhibitor H-89 nicht in der Lage war, die durch Verabreichung von AA ausgelöste inflammatorische Reaktion der mit LPS stimulierten Rattenlungen zu verhindern.

Dagegen deutet die durch verschiedene PKC-Inhibitoren erzielte Hemmung der erhöhten vasalen und bronchialen Konstriktion sowie Ödembildung der durch zweistündige Perfusion mit LPS stimulierten Rattenlunge auf eine Beteiligung mehrerer PKC-Isoenzyme hin, darunter die konventionellen PKC-Isoenzyme, die Isoenzyme aus der Gruppe der neuen PKC-Isoenzyme als auch eines der atypischen PKC-Isoenzyme.

Die Versuche mit isolierter und kombinierter Verabreichung von LTA und PepG zeigten, dass diese grampositiven Bakterienwandbestandteile insbesondere bei kombinierter Anwendung eine dem "gramnegativen Priming" ähnliche "Priming"-Reaktion mit erhöhter vaskulärer und bronchialer Reaktivität in der Rattenlunge verursachen.

Der Einsatz verschiedener PKC-Inhibitoren erzielte eine verminderte pulmonale Reaktivität der mit LTA und PepG stimulierten Rattenlungen auf die Verabreichung

von AA und lässt somit, ähnlich wie bei den Versuchen der PKC-Inhibitoren bei "gramnegativem Priming", die Beteiligung verschiedener Isoenzyme aus den Gruppen der konventionellen PKC-Isoenzyme sowie zusätzlich der neuen PKC-Isoenzyme und der atypischen PKC-Isoformen an der "grampositiven Priming"-Reaktion vermuten.

Weitere in dieser Arbeit durchgeführte Versuche bestätigten die Hypothese, dass die MAPK ERK1/2 und p38-MAPK, ähnlich wie bei der "Priming"-Reaktion durch gramnegatives LPS, auch an der durch LTA und PepG grampositiver Bakterien ausgelösten intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind.

Die Hochregulation der Cox-2-Expression scheint als ein wichtiges, für die Vaso- und Bronchoreaktivität verantwortliches Effektorsystem zu fungieren. Die in den Untersuchungen eingesetzten spezifischen Inhibitoren der entsprechenden Enzyme konnten erfolgreich die durch AA provozierte Reaktion der Lunge nach grampositiver Stimulation, gekennzeichnet durch verstärkte Broncho- und Vasokonstriktion sowie Ödembildung, verhindern.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der isolierten Rattenlunge sowohl die Verabreichung des gramnegativen Bakterienwandbestandteiles LPS als auch der grampositiven Bakterienwandbestandteile LTA und PepG in Kombination eine "Priming"-Reaktion auslösen können, die in ihrer Erscheinung den klinischen Symptomen des ARDS ähnelt. Die durch vermehrte Eikosanoidproduktion in der Lunge bewirkte vasale und bronchiale Konstriktion mit Permeabilitätserhöhung nach Stimulation durch die grampositiven und gramnegativen Bakterienwandbestandteile wird über eine Signaltransduktionskaskade vermittelt, an der mehrere Proteinkinase C-Isoenzyme und die MAPK p38-MAPK und ERK1/2 beteiligt sind, mit nachfolgender Hochregulation der Cox-2-Expression.

Diese Enzyme stellen somit ein interessantes Ziel für die Entwicklung weiterer therapeutischer Interventionsstrategien gegen die Entstehung des ARDS dar. Insbesondere die Rolle der einzelnen PKC-Isoenzyme sollte in weiteren Studien noch näher untersucht werden.

7. SUMMARY

Sepsis caused by gram negative bacteria and frequently during the last few years also by gram positive bacteria often leads to the life-threatening disease ARDS. As for ARDS, an overwhelming inflammatory reaction of the lung causes profound disturbances of the pulmonary vasomotion and ventilation as well as damage of the alveolocapillary barrier with permeability disturbance of the capillary endothelium and formation of an interstitial and/or intraalveolar pulmonary edema, often with fatal consequences. The exact mechanisms causing this damage of the lung have not yet been completely cleared.

In order to examine the complex pathogenetic procedures more precisely during the exsudative phase of ARDS, isolated perfused lungs have been used as a model system since a long time. The model of the isolated, blood-free perfused and ventilated rat lung used in this study offers the possibility of performing studies in an intact organ with functioning physiological regulation mechanisms that can be instrumentally measured and directly analysed.

After administering a second inflammatory stimulus such as arachidonic acid, the gram negative bacteria wall component lipopolysaccharide causes an increased vascular and bronchial reaction with an increased capillary and alveolar permeability in isolated lungs. This "Priming" effect is similar to the pathophysiological features and clinical symptoms of ARDS. The basis for this "Priming" reaction is a signal transduction cascade induced by LPS with participation of MAPK p38-MAPK and ERK1/2. Both induce an upregulation of Cox-2 by activating the NF κ B complex with simultaneously increased expression of the TX synthase in the smooth vascular and bronchial muscle cells and thus an increased formation of eicosanoids.

In this study we examined the exact involvement of protein kinase A and protein kinase C isoenzymes in the intracellular signal transduction of the "gram negative Priming" using cell wall component LPS of *Salmonella enterica serovar Abortusequi*, PKA inhibitor H-89 and PKC inhibitors Gö 6976, myristoylated PKC β_{C2-4} inhibitor, Ro-31-8425, Ro-32-0432, Bisindolylmaleimide I and Gö 6983.

A further objective of this study was to verify the assumption that gram positive bacteria wall components lipoteichoic acid and peptidoglycan are able to induce a reaction comparable to the "endotoxin Priming" by activating similar signal transduction cascades and cell-specific effector systems such as LPS. For that purpose, the stimulation of rat lungs by LTA and PepG of *Staphylococcus aureus* has been examined. Inhibitors of PKC Bisindolylmaleimide I, Gö 6976 and Gö 6983, inhibitors of MAPK ERK1/2 and p38-MAPK UO126 and SB-203580 as well as inhibitors of Cox-2 NS-398, SC-236 and DUP-697 have been used to suppress pulmonary reactivity.

The results of the tests show that PKA is not involved in signal transduction caused by LPS, since inhibitor H-89 was not able to prevent the AA-induced inflammatory reaction of the rat lungs stimulated with LPS.

On the other hand the inhibition of an increased vascular and bronchial constriction as well as edema formation in rat lungs stimulated during a two-hour perfusion by LPS obtained by different PKC inhibitors indicates an involvement of several PKC isoenzymes, among them conventional PKC isoenzymes, isoenzymes from the group of new PKC isoenzymes as well as one of the atypical PKC isoenzymes.

Tests with separate and combined medication of LTA and PepG show that these gram positive bacteria wall components cause, in particular when combined, a "Priming" reaction with increased vascular and bronchial reactivity of the rat lung similar to "gram negative Priming".

The employment of different PKC inhibitors shows a decreased AA-induced pulmonary reactivity of the rat lungs stimulated with LTA and PepG which gives rise to the supposition that conventional PKC isoenzymes as well as the new PKC isoenzymes and the atypical PKC isoforms are involved in "gram positive Priming" reaction similar to the tests of PKC inhibitors with "gram negative Priming".

Further tests in this study confirmed the hypothesis that MAPK ERK1/2 and p38-MAPK, similar to the "Priming" reaction caused by gram negative LPS, are also

involved in intracellular signal transduction triggered by LTA and PepG of gram positive bacteria.

Upregulation of Cox-2-expression seems to be an important effector system for vaso- and bronchoreactivity. The specific inhibitors of the corresponding enzymes used could successfully prevent the reaction of the lung provoked by AA after gram positive stimulation, which is characterised by an increased broncho- and vasoconstriction as well as edema formation.

In conclusion, it can be seen that an administering of both gram negative bacteria wall component LPS as well as gram positive bacteria wall components LTA and PepG in combination can induce a "Priming" reaction in the isolated rat lung resembling the clinical symptoms of ARDS. The vascular and bronchial constriction with increased permeability caused by augmented eicosanoid production in the lung after stimulation by gram positive and gram negative bacteria wall components is lead through a signal transduction cascade where several protein kinase C isoenzymes, p38-MAPK and ERK1/2 are involved with corresponding upregulation of Cox-2 expression. These enzymes therefore represent an interesting target for the development of further therapeutical intervention strategies against the development of ARDS. In particular, the role of the individual PKC isoenzymes should be examined more detailed in further studies.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Aderem AA, Cohen DS, Wright SD, Cohn ZA. Bacterial lipopolysaccharides prime macrophages for enhanced release of arachidonic acid metabolites. *J Exp Med.* **1986**;164:165-179.

Akimoto KR, Takahashi R, Moriya S, Nishioka N, Takayanagi J, Kimura K, Fuqua Y, Hirai S-I, Kazlauskas A, Ohno S. EGF or PDGF receptors activate atypical PKC λ through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J.* **1996**;15(4):788-798.

Aksoy E, Amraoui Z, Goriely S, Goldman M, Willems F. Critical role of protein kinase C epsilon for polysaccharide-induced IL-12 synthesis in monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* **2002**;32(11):3040-3049.

Aksoy E, Goldman M, Willems F. Protein kinase C epsilon: a new target to control inflammation and immune-mediated disorders. *Int J Biochem Cell Biol.* **2004**;36(2):183-188.

Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* **2000**;12:13-19.

Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Yeol Kim J, Abraham E. Involvement of PKC α /beta in TLR4 and TLR2 dependent activation of NF κ B. *Cell Signal.* **2005**;17(3):385-394.

Ashbough DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* **1967**;2:319-323.

Bandla HP, Simakajornboon N, Graff GR, Gozal D. Protein kinase C modulates ventilatory patterning in the developing rat. *Am J Respir Crit Care Med.* **1999**;159(3):968-973.

Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, Nguyen B, Tsing S, Bach C, Freire J, et al. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta.* **1994**;1209(1):130-139.

Basu A. The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmacol Ther.* **1993**;59(3):257-280.

Beutler B. Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Curr Opin Microbiol.* **2000**;3:23-28.

Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature.* **2004**;430(6996):257-263.

Birchall AM, Bishop J, Bradshaw D, Cline A, Coffey J, Elliott LH, Gibson VM, Greenham A, Hallam TJ, Harris W. Ro 32-0432, a selective and orally active inhibitor of protein kinase C prevents T-cell activation. *J Pharmacol Exp Ther.* **1994**;268(2):922-929.

Black JD. Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front Biosci.* **2000**;5:406-423.

Blobe GC, Obeid LM, Hannun YA. Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev.* **1994**;13(3-4):411-431.

Börsch-Haubold AG, Pasquet S, Watson SP. Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. SB 203580 also inhibits thromboxane synthase. *J Biol Chem.* **1998**;273(44):28766-28772.

Bone RC. Gram positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med.* **1994**;154:26-34.

Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis.* **1986**;133:913-927.

Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, French Bacteremia-Sepsis Study Group. Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. *Am J Respir Crit Care Med.* **1996**;154:617-624.

Byrd CA, Bornmann W, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pavietich N, Rosen N, Nathan CF, Ding A. Heat shock protein 90 mediates macrophage activation by Taxol and bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1999**;96(10):5645-5650.

Caivano M, Cohen P. Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and Il-1 beta in RAW 264 macrophages. *J Immunol.* **2000**;164:3018-3025.

Card GL, Jasuja RR, Gustafson GL. Activation of arachidonic acid metabolism in mouse macrophages by bacterial amphiphiles. *J Leukoc Biol.* **1994**;56(6):723-728.

Carter AB, Monick MM, Hunninghake GW. Both Erk and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **1999**;20:751-758.

Castrillo A, Pennington DJ, Otto F, Parker PJ, Owen MJ, Bosca L. Protein kinase C ϵ is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med.* **2001**;194:1231-1242.

Castrillo A, Traves PG, Martin-Sanz P, Parkinson S, Parker PJ, Bosca L. Potentiation of protein kinase C zeta activity by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) induces an imbalance between mitogen-activated protein kinases and NF-kappa B that promotes apoptosis in macrophages. *Mol Cell Biol.* **2003**;23(4):1196-1208.

Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nuñez G, Inohara N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.* **2003**;4(7):702-707.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. Cox-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2002**;99(21):13926-13931.

Chang YC, Li PC, Chen BC, Chang MS, Wang JL, Chiu WT, Lin CH. Lipoteichoic acid-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, prostaglandin E2, protein kinase A, p38 MAPK, and nuclear factor-kappaB pathways. *Cell Signal.* **2006**;18(8):1235-1243.

Chano F, Descoteaux A. Modulation of lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation by protein kinase C- α in a mouse macrophage cell line. *Eur J Immunol.* **2002**;32(10):2897-2904.

Chen BC, Liao CC, Hsu MJ, Liao YT, Lin CC, Sheu JR, Lin CH. Peptidoglycan-induced IL-6 production in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, PGE2/PGE4 receptors, protein kinase A, I kappa B kinase, and NF-kappa B. *J Immunol.* **2006**;177(1):681-6893.

Chen BC, Lin WW. PKC- and ERK-dependent activation of I kappa B kinase by lipopolysaccharide in macrophages: enhancement by P2Y receptor-mediated CaMK activation. *Br J Pharmacol.* **2001**;134(5):1055-1065.

Chen C, Chen YH, Lin WW. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression in J774 macrophages. *Immunology.* **1999a**;97(1):124-129.

Chen CC, Chiu KT, Sun YT, Chen WC. Role of the cyclic AMP-protein kinase A pathway in lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. Involvement of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* **1999b**;274(44):31559-31564.

Chen CC, Wang JK, Lin SB. Antisense oligonucleotides targeting protein kinase C- α , - β , or - δ , but not - η inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages: involvement of a nuclear factor-kappa-B-dependent mechanism. *J Immunol.* **1998**;161:6206-6214.

Cheon IS, Woo SS, Kang SS, Im J, Yun CH, Chung DK, Park DK, Han SH. Peptidoglycan-mediated IL-8 expression in human alveolar type II epithelial cells requires lipid raft formation and MAPK activation. *Mol Immunol.* **2008**;45(6):1665-1673.

Chiang LL, Kuo CT, Wang CH, Chen TF, Ho YS, Kuo HP, Lin CH. Involvement of nuclear factor-kappa B in lipoteichoic acid-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages. *J Pharm Pharmacol.* **2003**;55(1):115-123.

Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem.* **1990**;265(9):5267-5272.

Cho SY, Park SJ, Kwon MJ, Jeong TS, Bok SH, Choi WY, Jeong WI, Ryu SY, Do SH, Lee CS, Song JC, Jeong KS. Quercetin suppresses proinflammatory cytokine production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem.* **2003**;243(1-2):153-160.

Clerk A, Sugden PH. The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs). *FEBS Lett.* **1998**;426(1):93-96.

Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect Immun.* **1996**;64(6):1906-1912.

Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol.* **1990**;10:1498-1506.

Comalada M, Xaus J, Valledor AF, Lopez-Lopez C, Pennington DJ, Celada A. PKC epsilon is involved in JNK activation that mediates LPS-induced TNF-alpha, which induces apoptosis in macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2003**;285(5):C1235-1245.

Combest WL, Bloom TJ, Gilbert LI. Polyamines differentially inhibit cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation in the brain of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Neurochem.* **1988**;51(5):1581-1591.

Cooper DR, Watson JE, Patel N, Illingworth P, Acevedo-Duncan M, Goodnight J, Chalfant CE, Mischak H. Ectopic expression of protein kinase C-beta1, -delta, and -epsilon, but not -beta2 or -zeta, provide for insulin stimulation of glucose uptake in NIH-3T3 cells. *Arch Biochem Biophys.* **1999**;372(1):69-79.

Copeland RA, Williams JM, Giannaras J, Nurnberg S, Covington M, Pinto D, Pick S, Trzaskos JM. Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1994**;91(23):11202-11206.

Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* **1995**;364(2):229-233.

Cuschieri J, Umanskiy K, Solomkin J. PKC-zeta is essential for endotoxin-induced macrophage activation. *J Surg Res.* **2004**;121(1):76-83.

da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem.* **2001**;276(24):21129-21135.

Davies NM, Good RL, Roupe KA, Yanez JA. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?-Not as easy as 1, 2, 3. *J Pharm Pharm Sci.* **2004**;7(2):217-226.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* **2000**;351:95-105.

Davidson KG, Bersten AD, Barr HA, Dowling KD, Nicholas TE, Doyle IR. Endotoxin induces respiratory failure and increases surfactant turnover and respiration independent of alveolocapillary injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* **2002**;165(11):1516-1525.

De Kimpe SJ, Kengatharan M, Thiemermann C, Vane JR. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1995**;92(22):10359-10363.

Dekker LV, Parker PJ. Protein kinase C a question of specificity. *Trends Biochem Sci.* **1994**;19(2):73-77.

DeLong P, O'Sullivan MG, Huggins E, Hubbard CL, MacCall C. Bacterial lipopolysaccharide induction of the prostaglandin G/H synthase 2 gene causes thromboxane-dependent pulmonary hypertension in rabbits. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **1999**;20:493-499.

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* **1998**;396(6710):474-477.

DeSilva DR, Jones EA, Favata MF, Jaffee BD, Magolda RL, Trzaskos JM, Scherle PA. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *J Immunol.* **1998**;160(9):4175-4181.

Dessing MC, Schouten M, Draing C, Levi M, von Aulock S, van der Poll T. Role played by Toll-like receptors 2 and 4 in lipoteichoic acid-induced lung inflammation and coagulation. *J Infect Dis.* **2008**;197(2):245-252.

Doerfler ME, Danner RL, Shelhamer JH, Parillo JE. Bacterial lipopolysaccharides prime human neutrophils for enhanced production of leukotriene B₄. *J Clin Invest.* **1989**;83:970-977.

Dou W, Jiao Y, Goorha S, Raghov R, Ballou LR. Nociception and the differential expression of cyclooxygenase-1 (Cox-1), the Cox-1 variant retaining intron-1 (Cox-1v), and Cox-2 in mouse dorsal root ganglia (DRG). *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2004**;74(1-4):29-43.

Duncia JV, Santella JB, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Fietze WE, Rankin FW, Sun JH, Earl RA, Tabaka AC, Teleha AC, Blom KF, Favata MF, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Horiuchi K, Copeland RA, Scherle PA, Trzaskos JM, Magolda RL, Trainor GL, Wexler RR, Hobbs FW, Olson RE. MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of UO126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett.* **1998**;8(20):2839-2844.

Dziarski R, Jin YP, Gupta D. Differential activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1, ERK2, p38, and c-Jun NH₂-terminal kinase mitogen-activated protein kinases by bacterial peptidoglycan. *J Infect Dis.* **1996**;174(4):777-785.

Dziarski R, Tapping RI, Tobias PS. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J Biol Chem.* **1998**;273(15):8680-8690.

Eichholtz T, de Bont DB, de Widt J, Liskamp RM, Ploegh HL. A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor. *J Biol Chem.* **1993**;268(3):1982-1986.

El-Samalouti VT, Schletter J, Chyla I, Lentschat A, Mamt U, Brade L, Flad HD, Ulmer AJ, Hamann L. Identification of the 80 k-DA LPS-binding protein (LMP80) as decayaccelerating factor (DAF, CD55). *FEMS Immunol Med Microbiol.* **1999**;23:259-269.

Ermert L, Ermert M, Althoff A, Merkle M, Grimminger F, Seeger W. Vasoregulatory prostanoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in noninflamed rat lungs. *J Pharmacol Exp Ther.* **1998a**;286:1309-1314.

Ermert L, Ermert M, Duncker H-R, Grimminger F, Seeger W. In situ localization and regulation of thromboxane A₂ synthase in normal and LPS-primed lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2000a**;278:L744-L753.

Ermert L, Ermert M, Goppelt-Struebe M, Merkle M, Duncker H-R, Grimminger F, 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.* **2000b**;156:1275-1278.

Ermert L, Ermert M, Goppelt-Struebe M, Walmrath D, Grimminger F, Steudel W, Ghofrani HA, Homberger C, Duncker H-R, Seeger W. Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **1998b**;18:479-488.

Ermert M, Kuttner D, Eisenhardt N, Dierkes C, Seeger W, 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.* **2003**;83(3):333-347.

- Ermert M, Merkle M, Mootz R, Grimminger F, Seeger W, Ermert L.** Endotoxin priming of the cyclooxygenase-2-thromboxane axis in isolated rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2000c**;278:L1195-L1203.
- Ermert M, Ruppert C, Gunther A, Duncker HR, Seeger W, Ermert L.** Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab Invest.* **2002**;82(4):425-441.
- Esbenshade AM, Newman JH, Lams PM, Jolles H, Brigham KL.** Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: lung mechanics and lung fluid balance. *J Appl Physiol.* **1982**;53(4):967-976.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM.** Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.* **1998**;273(29):18623-18632.
- Félétou M, Staczek J, Duhault J.** Vascular endothelial growth factor and the in vivo increase in plasma extravasation in the hamster cheek pouch. *Br J Pharmacol.* **2001**;132(6):1342-8.
- Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E, Wilson CB, Hwang D.** Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys.* **1993**;307:361-368.
- Findik D, Song Q, Hidaka H, Lavin M.** Protein kinase A inhibitors enhance radiation-induced apoptosis. *J Cell Biochem.* **1995**;57(1):12-21.
- Fischer W.** Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv Microb Physiol.* **1988**;29:233-302.
- Fischer W, Markwitz S, Labischinski H.** Small-angle X-ray scattering analysis of pneumococcal lipoteichoic acid phase structure. *Eur J Biochem.* **1997**;244:913-917.
- Fisher AB, Itakura N, Dodia C, Thurman RG.** Relationship between alveolar PO₂ and the rate of p-nitroanisole O-demethylation by the cytochrome P-450 pathway in isolated rabbit lungs. *J Clin Invest.* **1979**;64(3):770-774.
- Forehand JR, Pabst MJ, Philipps JA, Johnston Jr RB.** Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. *J Clin Invest.* **1989**;83:74-83.
- Fournier T, Riches DW, Winston BW, Rose DM, Young SK, Noble PW, Lake FR, Henson PM.** Divergence in macrophage insulin-like growth factor-I (IGF-I) synthesis induced by TNF-alpha and prostaglandin E2. *J Immunol*; **1995**;155(4):2123-2133.
- Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V.** Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med.* **1998**;18:479-488.

Fujihara M, Muroi M, Muroi Y, Ito N, Suzuki T. Mechanism of lipopolysaccharide-triggered junB activation in a mouse macrophage-like cell line (J774). *J Biol Chem.* **1993**;268(20):14898-14905.

Fujihara M, Conolly N, Ito N, Suzuki T. Properties of protein kinase C isoforms (β II, ϵ and γ) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production. *J Immunol.* **1994**;152:1898-1906.

Futaki N, Takahashi S, Yokoyama Marai I, Huguchi S, Otomo S. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins.* **1994**;47(1):55-59.

Geilen CC, Wieprecht M, Wieder T, Reutter W. A selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-bromocinnamyl(amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in HeLa cells. *FEBS Lett.* **1992**;309(3):381-384.

Gekeler V, Boer R, Uberall F, Ise W, Schubert C, Utz I, Hofmann J, Sanders KH, Schächtele C, Klemm K, Grunicke H. Effects of the selective bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitor GF 109203X on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Br J Cancer.* **1996**;74(6):897-905.

Geppert TD, Whitehurst CE, Thompson P, Beutler B. Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the ras/raf-1/MEK/MAPK pathway. *Mol Med.* **1994**;1(1):93-103.

Ghosh S, Latimer RD, Gray BM, Harwood RJ, Oduro A. Endotoxin-induced organ injury. *Crit Care Med.* **1993**;21:19-24.

Ghosh AK, Hirasawa N, Ohuchi K. Enhancement by histamine of vascular endothelial growth factor production in granulation tissue via H(2) receptors. *Br J Pharmacol.* **2001**;134(7):1419-1428.

Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. Staphylococcal Cell Wall: Morphogenesis and Fatal Variations in the Presence of Penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev.* **1998**;62(4):1371-1414.

Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jéhanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zähringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* **2003a**;300(5625):1584-1587.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* **2003b**;278(11):8869-8872.

Giroux M, Descoteaux A. Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: modulation by protein kinase C- α . *J Immunol.* **2000**;165(7):3985-3991.

Glauser FL, Egan P, Millen JE, Fischer P, Propst K, Lewis J, Chetty K. The effect of salicylate infusion on the alveolar epithelial membrane in the isolated perfused lung. *Crit Care Med.* **1978**;6(3):181-184.

Goldfeld AE, Strominger JL, Doyle C. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation in phorbol ester stimulated T and B cell lines. *J Exp Med.* **1991**;174:73-81.

Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U. Nonphorbol tumor promoters okadaic acid and calyculin-A induce membrane translocation of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* **1992**;189(2):950-957.

Gopalakrishna R, Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* **2000**;28(9):1349-1361.

Grimminger F, Wahn H, Kramer HJ, Stevens J, Mayer K, Walmrath D, Seeger W. Differential influence of arachidonic vs. eicosapentaenoic acid on experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* **1995**;268(6 Pt 2):H2252-2259.

Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ. Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett.* **1996**;392(2):77-80.

Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR. Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem.* **1998**;273(44):28670-28676.

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

Gupta D, Kirkland TN, Viriyakosol S, Dziarski R. CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *J Biol Chem.* **1996**;271(38):23310-23316.

Hadley JS, Wang JE, Foster SJ, Thiemermann C, Hinds CJ. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. *Infect Immun.* **2005**;73(11):7613-7619.

Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med.* **1994**;179(1):269-277.

Hambleton J, Weinstein SL, Lem L, De Franco AL. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1996**;93:2774-2778.

Han YL, Kang J, Li SH. Protein kinase C and protein tyrosine kinase mediate lipopolysaccharide- and cytokine-induced nitric oxide formation in vascular smooth muscle cells of rats. *Sheng Li Xue Bao.* **2003**;55(3):265-272.

Hanaoka M, Ge RL, Kaneki T, Koizumi T, Kobayashi T, Kubo K. Effect of tacrolimus on endotoxin-induced lung injury in sheep. *Respir Physiol Neurobiol.* **2002**;130(1):89-97.

Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **1995**;9(8):576-596.

Harmon CS, Nevins TD, Ducote J, Lutz D. Bisindolylmaleimide protein-kinase-C inhibitors delay the decline in DNA synthesis in mouse hair follicle organ cultures. *Skin Pharmacol.* **1997**;10(2):71-78.

Hasan FM, Teplitz C, Farrugia R, Huan E, Schwartz S. Lung function and structure after *Escherichia coli* endotoxin in rabbits: effect of dose and rate of administration. *Circ Shock.* **1984**;13(1):1-19.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* **1988**;52:269-279.

Hattori Y, Kasai K, Akimoto K, Thiemermann C. Induction of NO synthesis by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in J774 macrophages: involvement of a CD14-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* **1997**;233(2):375-379.

Hauf N, Goebel W, Fiedler F, Sokolovic Z, Kuhn M. *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF-kappaB (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1997**;94(17):9394-9399.

Hayashi H, Koike H, Imanishi N, Tojo SJ. The effects of delayed treatment with sialyl Lewis X against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rabbits. *Eur J Pharmacol.* **2000**;392(1-2):109-116.

He H, Kogut MH. CpG-ODN-induced nitric oxide production is mediated through clathrin-dependent endocytosis, endosomal maturation, and activation of PKC MEK1/2 and p38 MAPK, and NF-kappaB pathways in avian macrophage cells (HD11). *Cell Signal.* **2003**;15(10):911-917.

Heine H, Ulmer AJ, El-Samalouti VT, Lentschat A, Hamann L. Decay-accelerating factor (DAF/CD55) is a functional active element of the LPS receptor complex. *J Endotoxin Res.* **2001**;7(3):227-231.

Hermann C, Spreitzer I, Schröder NW, Morath S, Lehner MD, Fischer W, Schutt C, Schumann RR, Hartung T. Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species-role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-gamma release. *Eur J Immunol.* **2002**;32(2):541-551.

Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weiss JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol.* **2000**;165:618-622.

- Hoffmann H, Siebeck M, Spannagl M, Weis M, Geiger R, Jochum M, Fritz H.** Effect of recombinant hirudin, a specific inhibitor of thrombin, on endotoxin-induced intravascular coagulation and acute lung injury in pigs. *Am Rev Respir Dis.* **1990**;142(4):782-788.
- Holtzman MJ.** State of the art. Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease. *Am Rev Respir Dis.* **1991**;143(1):188-203.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S.** Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol.* **1999**;162:3749-3752.
- Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ.** Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* **1995**;151:293-301.
- Hug R, Sarre TF.** Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J.* **1993**;291:329-343.
- Hwang D, Jang BC, Yu G, Boudreau M.** Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages. *Biochem Pharmacol.* **1997**;54(1):87-96.
- Ingalls RR, Arnaout MA, Golenbock DT.** Outside-in signalling by lipopolysaccharide through a tailless integrin. *J Immunol.* **1997**;159(1):433-438.
- Ingalls RR, Golenbock DT.** CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med.* **1995**;181(4):1473-1479.
- Ingalls RR, Monks BG, Savedra R, Christ WJ, Delude RI, Medvedev AE, Espevick T, Golenbock DT.** CD11/CD18 and CD14 share a common Lipid A signalling pathway. *J Immunol.* **1998**;161:5413-5420.
- Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G.** Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.* **2003**;278(8):5509-5512.
- Janssen LJ, Tazzeo T.** Involvement of TP and EP3 receptors in vasoconstrictor response to isoprostanes in pulmonary vasculature. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002**;302(3):1060-1066.
- Jerala R.** Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol.* **2007**;297(5):353-363.

Kanke T, Macfarlane SR, Seatter MJ, Davenport E, Paul A, McKenzie RC, Plevin R. Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J Biol Chem.* **2001**;276(34):31657-31666.

Kao SJ, Lei HC, Kuo CT, Chang MS, Chen BC, Chang YC, Chiu WT, Lin CH. Lipoteichoic acid induces nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide synthase expression via phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and p38 MAPK in RAW 264.7 macrophages. *Immunology.* **2005**;115(3):366-374.

Kargman S, Wong E, Greig GM, Falguyret JP, Cromlish W, Ethier D, Yergey JA, Riendeau D, Evans JF, Kennedy B, Tagari P, Francis DA, O'Neill GP. Mechanism of selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 in intact cells. *Biochem Pharmacol.* **1996**;52(7):1113-1125.

Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science.* **1998**;282:2275-2279.

Keffel S, Schmidt M, Bischoff A, Michel MC. Neuropeptide-Y stimulation of extracellular signal-regulated kinases in human erythroleukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **1999**;291(3):1172-1178.

Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med.* **1998**;188(2):305-315.

Kiss Z, Phillips H, Anderson WH. The bisindolylmaleimide GF 109203X, a selective inhibitor of protein kinase C, does not inhibit the potentiating effect of phorbol ester on ethanol-induced phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta.* **1995**;1265(1):93-95.

Knapp S, von Aulock S, Leendertse M, Haslinger I, Draing C, Golenbock DT, van der Poll T. Lipoteichoic Acid-Induced Lung Inflammation Depends on TLR2 and the Concerted Action of TLR4 and the Platelet-Activating Factor Receptor. *J Immunol.* **2008**;180(5):3478-34784.

Kontny E, Kurowska M, Szczepanska K, Maslinski W. Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes. *J Leukoc Biol.* **2000**;67(2):249-258.

Kramer HJ, Stevens J, Seeger W. Analysis of 2- and 3-series prostanoids by post-HPLC ELISA. *Anal Biochem.* **1993**;214(2):535-543.

Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain SNA. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* **1998**;158:1883-1889.

Ku WC, Cheng AJ, Wang TC. Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* **1997**;241(3):730-736.

Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* **1999**;263(3):825-831.

Kunsch C, Lang RK, Rosen CA, Shannon MF. Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol.* **1994**;153:153-164.

Kuo CT, Chiang LL, Lee CN, Yu MC, Bai KJ, Lee HM, Lee WS, Sheu JR, Lin CH. Induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*: involvement of protein kinase C- and nuclear factor-kappaB-dependent mechanisms. *J Biomed Sci.* **2003**;10(1):136-145.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* **2001**;81(2):807-869.

Lamping N, Dettmer R, Schröder NW, Pfeil D, Hallatschek W, Burger R, Schumann RR. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest.* **1998**;101:2065-2071.

Laping NJ, Olson BA, Short B, Albrightson CR. Thrombin increases clusterin mRNA in glomerular epithelial and mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* **1997**;8(6):906-914.

Laporte JD, Moore PE, Lahiri T, Schwartzman IN, Panettieri RA Jr, Shore SA. p38 MAP kinase regulates IL-1 beta responses in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2000**;279(5):L932-941.

Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology.* **2000**;47:185-201.

Lee JD, Kravchenko V, Kirkland TN, Han J, Mackman N, Moriarty A, Leturcq D, Tobias PS, Ulevitch PJ. Glycosylphosphatidylinositol-anchored or integral membrane forms of CD14 mediate identical cellular responses to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1993**;90:9930-9934.

Lee SC, Han JS, Seo JK, Cha YN. Modulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidylcholine specific phospholipase C and D in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Mol Cells.* **2003**;15(3):320-326.

Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* **1992**;267:25934-25938.

Leemhuis J, Boutillier S, Schmidt G, Meyer DK. The protein kinase A inhibitor H89 acts on cell morphology by inhibiting Rho kinase. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002**;300(3):1000-1007.

Le Roy D, Padova FD, Tees R, Lengacher S, Landmann R, Glauser MP, Calandra T, Heumann D. Monoclonal antibodies to murine lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) protect mice from lethal endotoxemia by blocking either the binding of LPS to LBP or the presentation of LPS/LBP complexes to CD14. *J Immunol* **1999**;162:7454-7460.

Li RC, Ping P, Zhang J, Wead WB, Cao X, Gao J, Zheng Y, Huang S, Han J, Bolli R. PKC- ϵ modulates NF- κ B and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2000**;279:H1679-1689.

Lien E, Mwans TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest.* **2000**;105(4):497-504.

Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem.* **1999**;274(47):33419-33425.

Lin CH, Kuan IH, Lee HM, Lee WS, Sheu JR, Ho YS, Wang CH, Kuo HP. Induction of cyclooxygenase-2 protein by lipoteichoic acid from staphylococcus aureus in human pulmonary epithelial cells: involvement of a nuclear factor-kappa-B-dependent pathway. *Br J Pharmacol.* **2001**;134(3):543-552.

Lin CH, Kuan IH, Wang CH, Lee HM, Lee WS, Sheu JR, Hsiao G, Wu CH, Kuo HP. Lipoteichoic acid-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of p44/42 and p38 mitogen-activated protein kinase signal pathways. *Eur J Pharmacol.* **2002**;450(1):1-9.

Lin MQ, Chang ZL. LPS and PMA induced PKC- α and PKC- ϵ activation and translocation in murine peritoneal macrophages. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* **1996**;29(4):429-434.

Lin MQ, Chang ZL. Immunomodulated signaling in macrophages: regulation of the MAPK signaling pathway by PKA and PKC. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao.* **1999**;31(6):701-706.

Liu MK, Herrera-Velit P, Brownsey RW, Reiner NE. CD-14 dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* **1994**;153:2642-2652.

Liu SF, Newton R, Evans TW, Barnes PJ. Differential regulation of cyclooxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 gene expression by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Clin Sci.* **1996**;90:301-306.

Lozano J, Berra E, Municio MM, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Sanz L, Moscat J. Protein kinase C ζ isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem.* **1994**;269(30):19200-19202.

Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, Bonde J. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark and Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* **1999**;159:1849-1861.

Lynn WA, Liu Y, Golenbock DT. Neither CD14 nor serum is absolutely necessary for activation of mononuclear phagocytes by bacterial lipopolysaccharide. *Infect Immun.* **1993**;61:4452-4461.

Mancuso G, Midiri A, Beninati C, Piraino G, Valenti A, Nicocia G, Teti D, Cook J, Teti G. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappa B are involved in TNF-alpha responses to group B streptococci. *J Immunol.* **2002**;169(3):1401-1409.

Martin TR, Mathison JC, Tobias PS, Leturcq DJ, Moriarty AM, Maunder RJ, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs. *J Clin Invest.* **1992**;90:2209-2219.

Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D, Schächtele C. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *Biol Chem.* **1993**;268(13):9194-9197.

Masferrer JL, Koki A, Seibert K. COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents. *Ann N Y Acad Sci.* **1999**;889:84-86.

Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1994**;91(8):3228-3232.

Matsuda N, Yamazaki H, Takano K, Matsui K, Takano Y, Kemmotsu O, Hattori Y. Priming by lipopolysaccharide exaggerates acute lung injury and mortality in responses to peptidoglycan through up-regulation of Toll-like receptor-2 expression in mice. *Biochem Pharmacol.* **2008**;75(5):1065-1075.

Matsuguchi T, Musikachoen T, Johnson TR, Kraft AS, Yoshikai Y. A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase is an important negative regulator of lipopolysaccharide-mediated c-jun N-terminal kinase activation in mouse macrophage cell lines. *Mol Cell Biol.* **2001**;21:6999-7009.

Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1993**;90(21):10193-10197.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. **1997**;388:394-397.

Mehanna A, Vitorino DC, Panis C, Blanco EE, Pinge-Filho P, Martins-Pinge MC. Cardiovascular and pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training. *Life Sci*. **2007**;81(16):1301-1308.

Meng X, Khanuja BS, Ip YT. Toll receptor-mediated Drosophila immune response requires Dif, an NF- κ B factor. *Genes Dev*. **1999**;13:792-797.

Merritt JE, Sullivan JA, Tse J, Wilkinson S, Nixon JS. Different sensitivities of neutrophil responses to a selective protein kinase C inhibitor Ro 31-8425; redundancy in signal transduction. *Cell Signal*. **1997**;9(1):53-57.

Mestre JR, Mackrell PJ, Rivadeneira DE, Stapleton PP, Tanabe T, Daly JM. Redundancy in the signaling pathways and promoter elements regulating cyclooxygenase-2 gene expression in endotoxin-treated macrophage/monocytic cells. *J Biol Chem*. **2001**;276(6):3977-3982.

Meyrick B, Hislop A, Reid L. Pulmonary arteries of the normal rat: the thick walled oblique muscle segment. *J Anat*. **1978**;125:209-221.

Meyrick B, Hoover R, Jones MR, Berry LC Jr, Brigham KL. In vitro effects of endotoxin on bovine and sheep lung microvascular and pulmonary artery endothelial cells. *J Cell Physiol*. **1989**;138(1):165-174.

Middeleveld RJ, Alving K. Synergistic septicemic action of the gram-positive bacterial cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid in the pig in vivo. *Shock*. **2000**;13(4):297-306.

Milberg JA, Davis DR, Steinberg KP, Hudson LD. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): 1983-1993. *JAMA*. **1995**;273(4):306-309.

Mitchell MD, Bibby JG, Hicks BR, Redman CW, Anderson AB, Turnbull AC. Thromboxane B2 and human parturition: concentrations in the plasma and production in vitro. *J Endocrinol*. **1978**;78(3):435-441.

Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*. **2004**;12(4):186-192.

Modig J, Borg T. High-dose methylprednisolone in a porcine model of ARDS induced by endotoxemia. *Acta Chir Scand Suppl*. **1985**;526:94-103.

Moine P, McIntyre R, Schwartz MD, Kaneko D, Shenkar R, Le Tulzo Y, Moore EE, Abraham E. NF- κ B regulatory mechanisms in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Shock*. **2000**;13(2):85-91.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* **1993**;329(27):2002-2012.

Monick MM, Carter AB, Flaherty DM, Peterson MW, Hunninghake GW. Protein kinase C zeta plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages. *J Immunol.* **2000**;165(8):4632-4639.

Monick MM, Carter AB, Gudmundsson G, Mallampalli R, Powers LS, Hunninghake GW. A phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates activation of p42/44 mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated human alveolar macrophages. *J Immunol.* **1999**;162(5):3005-3012.

Morris AH, Wallace CJ, Menlove RL, Clemmer TP, Orme JF Jr, Weaver LK, Dean NC, Thomas F, East TD, Pace NL. Randomized clinical trial of pressure-controlled inverse ratio ventilation and extracorporeal CO₂ removal for adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* **1994**;149:295-305.

Moxley MA, Longmore WJ. Effect of experimental diabetes and insulin on lipid metabolism in the isolated perfused rat lung. *Biochem Biophys Acta.* **1977**;488(2):218-224.

Murch O, Abdelrahman M, Kapoor A, Thiemermann C. Muramyl dipeptide enhances the response to endotoxine to cause multiple organ injury in the anesthetized rat. *Shock. Epub* **2007** Aug 9.

Muroi M, Suzuki T. Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF-kappa B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774. *Cell Signal.* **1993**;5(3):289-298.

Musashi M, Ota S, Shiroshita N. The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J Hematol.* **2000**;72(1):12-19.

Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* **2003**;3:667-672.

Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S, Kurihara T. Suppression of lipopolysaccharide-dependent tumor necrosis factor alpha induction in rat microglia, in which protein kinase C alpha is down-regulated. *Neurosci Lett.* **2003**;343(1):33-36.

Nakanishi H, Brewer KA, Exton JH. Activation of the ζ isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphate. *J Biol Chem.* **1993**;268(1):13-16.

Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.* **2001**;108(1):25-30.

Natanson C, Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Peart KW, Banks SM, MacVittie TJ, Walker RI, Parrillo JE. Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenges in a canine model of human septic shock. *J Clin Invest.* **1989**;83(1):243-251.

Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* **1999**; 63(1): 174-229.

Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* **1995**;270(48):28495-28498.

Newton R, Cambridge L, Hart LA, Stevens DA, Lindsay MA, Barnes PJ. The MAP kinase inhibitors, PD098059, UO126 and SB203580, inhibit IL-1 β -dependent PGE(2) release via mechanistically distinct processes. *Br J Pharmacol.* **2000**;130(6):1353-1361.

Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **1995**;9(7):484-496.

Norel X, de Montpreville V, Brink C. Vasoconstriction induced by activation of EP1 and EP3 receptors in human lung: effects of ONO-AE-248, ONO-DI-004, ONO-8711 or ONO-8713. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2004**;74(1-4):101-112.

Norel X, Walch L, Labat C, Gascard JP, Dulmet E, Brink C. Prostanoid receptors involved in the relaxation of human bronchial preparations. *Br J Pharmacol.* **1999**;126(4):867-872.

Nusing R, Ullrich V. Immunoquantitation of thromboxane synthase in human tissues. *Eicosanoids.* **1990**;3(3):175-180.

O'Byrne PM, Leikauf GD, Aizawa H, Bethel RA, Ueki IF, Holtzman MJ, Nadel JA. Leukotriene B₄ induces airway hyperresponsiveness in dogs. *J Appl Physiol.* **1985**;59(6):1941-1946.

O'Sullivan MG, Chilton FH, Huggins EM Jr, McCall CE. Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase. *J Biol Chem.* **1992**;267(21):14547-14550.

Ogletree ML. Pharmacology of prostaglandins in the pulmonary microcirculation. *Ann N Y Acad Sci.* **1982**;384:191-206.

Ogletree ML. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A₂. *Fed Proc.* **1987**;46(1):133-138.

Olson NC, Salzer WL, McCall CE. Biochemical, physiological and clinical aspects of endotoxemia. *Mol Aspects Med.* **1988**;10(6):511-629.

Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* **2000**;12(1):1-13.

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2000**;97(25):13766-13771.

Paik YH, Lee KS, Lee HJ, Yang KM, Lee SJ, Lee DK, Han KH, Chon CY, Lee SI, Moon YM, Brenner DA. Hepatic stellate cells primed with cytokines upregulate inflammation in response to peptidoglycan or lipoteichoic acid. *Lab Invest.* **2006**;86(7):676-686.

Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med.* **1993**;328(20):1471-1477.

Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, Akira Shizuo, Zaks-Zilberman M, Goyert SM, Vogel SN. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and Taxol-inducible gene expression. *J Immunol.* **2001**;166:574-581.

Petersen C, Petersen S, Milas L, Lang FF, Tofilon PJ. Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin Cancer Res.* **2000**;6(6):2513-2520.

Poltorak A, Smirnov I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan EK, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel SN, Beutler B. Defective LPS-signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* **1998**;282:2085-2088.

Pugin J, Schürer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1993**;90:2744-2748.

Qatsha KA, Rudolph C, Marmé D, Schächtele C, May WS. Gö 6976, a selective inhibitor of protein kinase C, is a potent antagonist of human immunodeficiency virus 1 induction from latent/low-level-producing reservoir cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**;90(10):4674-4678.

Qin N, Zhang S-P, Reitz TL, Mei JM, Flores CM. Cloning, expression and functional characterization of human cyclooxygenase-1 splicing variants: evidence for intron 1 retention. *J Pharmacol Exp Ther.* **2005**;315:1298-1305.

Qureshi S, Larivière L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (TLR4). *J Exp Med.* **1999**;189(4):615-625.

Radallah D, Nogaro M, Fournier B. Protein kinase C stimulates PtdIns-4,5-P2-phospholipase C activity. *Biochim Biophys Acta.* **1999**;1450(3):242-253.

Rasmussen H, Isales CM, Calle R, Throckmorton D, Anderson M, Gasalla-Herraiz J, McCarthy R. Diacylglycerol production, Ca²⁺ influx, and protein kinase C activation in sustained cellular responses. *Endocr Rev.* **1995**;16(5):649-681.

Reimann T, Büscher D, Hipskind RA, Krautwald S, Lohmann-Matthes M-L, Baccarini M. Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP Kinase pathway: a putative role for Raf-1 in the induction of the Il-1 β and the TNF- α genes. *J Immunol.* **1994**;153:5740-5749.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* **1992**;1267:54-61.

Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schonbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade FU, Di Padova F, Kusumoto S, Schumann RR. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and biological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol.* **1994a**;216:39-81.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, Brade H. Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **1994b**;8:217-225.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Ulmer AJ, Holst O, Brade H, Schmidt G, Mamat U, Grimmecke HD, Kusumoto S, Hringger U. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiol.* **1993**;187:169-190.

Rietschel ET, Seydel U, Zahringer U, Schade FU, Brade L, Loppnow H, Feist W, Wang MH, Ulmer AJ, Flad HD, Brandenburg K, Kirikae T, Grimmecke D, Holst O, Brade H. Bacterial endotoxin: Molecular relationships between structure and activity. *Infect Dis Clin North Am.* **1991**;5(4):753-779.

Rocco Jr TR, Reinert SE, Cioffi W, Harrington D, Buczko G, Simms HH. A 9-year, single-institution, retrospective review of death rate and prognostic factors in adult respiratory distress syndrome. *Ann Surg.* **2001**;233(3):414-422.

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**;95:588-593.

Rogalski SL, Appleyard SM, Pattillo A, Terman GW, Chavkin C. TrkB activation by brain-derived neurotrophic factor inhibits the G protein-gated inward rectifier Kir3 by tyrosine phosphorylation of the channel. *J Biol Chem.* **2000**;275(33):25082-25088.

Ron D, Luo J, Mochly-Rosen D. C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo. *J Biol Chem.* **1995**;270(41):24180-24187.

Russel JA, Walley KR. Acute Respiratory Distress Syndrome. Cambridge University Press. **1999**;8:40-41.

Rutschmann S, Jung AC, Hetru C, Reichhart JM, Hoffmann JA, Ferrandon D. The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity*. **2000**;12(5):569-580.

Ruud TE, Gundersen Y, Wang JE, Foster SJ, Thiemermann C, Aasen AO. Activation of cytokine synthesis by systemic infusions of lipopolysaccharide and peptidoglycan in a porcine model in vivo and in vitro. *Surg Infect (Larchmt)*. **2007**;8(5):495-503.

Salh B, Hoeflick K, Kwan W, Pelech S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 potentiate interferon-gamma-mediated endothelin production by human monocytes: role of protein kinase C. *Immunology*. **1998**;95(3):473-479.

Salzer WL, McCall CE. Primed stimulation of isolated perfused rabbit lung by endotoxin and platelet activating factor induces enhanced production of thromboxane and lung injury. *J Clin Invest*. **1990**;85(4):1135-1142.

Sanghera JS, Weinstein SL, Aluwalia M, Girn J, Pelech SL. Activation of multiple proline-directed kinases by bacterial lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Immunol*. **1996**;156(11):4457-4465.

Sauvage M, Mazière P, Fathallah H, Giraud F. Insulin stimulates NHE1 activity by sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C zeta in human erythrocytes. *Eur J Biochem*. **2000**;267(4):955-962.

Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol*. **1995**;164:383-389.

Schleifer KH, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev*. **1972**;36(4):407-477.

Schröder NW, Opitz B, Lamping N, Michelsen KS, Zahringer U, Gobel UB, Schumann RR. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema* glycolipids. *J Immunol*. **2000**;165(5):2683-2693.

Schröder NW, Pfeil D, Opitz B, Michelsen KS, Amberger J, Zahringer U, Gobel UB, Schumann RR. Activation of mitogen-activated protein kinases p42/44, p38, and stress-activated protein kinases in myelo-monocytic cells by *Treponema* lipoteichoic acid. *J Biol Chem*. **2001**;276(13):9713-9719.

Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line. A point mutation in a conserved region of md-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med*. **2001**;194(1):79-88.

Schütte H, Rosseau S, Czymek R, Ermert L, Walmrath D, Krämer H-J, Seeger W, Grimminger F. Synergism between endotoxin priming and exotoxin challenge in provoking severe vascular leakage in rabbit lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* **1997**;156:819-824.

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem.* **1999**;274(25):17406-17409.

Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **1995**;11:549-599.

Scott JD. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Pharmacol Ther.* **1991**;50(1):123-145.

Seeger W, Bauer M, Bhakdi S. Staphylococcal alpha-toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. Evidence for thromboxane formation and the role of extracellular calcium. *J Clin Invest.* **1984**;74:849-858.

Seeger W, Stöhr G, Wolf HRD, Neuhof H. Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J Appl Physiol.* **1985**;587:326-338.

Seeger W, Suttorp N. Role of membrane lipids in the pulmonary vascular abnormalities caused by bacterial toxins. *Am Rev Respir Dis.* **1987**;136:462-466.

Seeger W, Suttorp N, Muhly M, Bhakdi S. Thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage evoked by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in rabbit lungs. *J Clin Invest.* **1989a**;84:220-227.

Seeger W, Walmrath D, Grimminger F, Rosseau S, Schütte H, Krämer H-J, Ermert L, Kiss L. Acute respiratory distress syndrome - model systems using the isolated perfused rabbit lung. In: *Oxygen radicals in biological systems, part C*, ed. L. Packer, (A. Volume of *Methods in Enzymology*, eds. J. N. Abelson, M. I. Simon), Academic Press Inc. **1994**;549-584.

Seeger W, Walmrath D, Menger M, Neuhof H. Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. *J Appl Physiol.* **1986**;61(5):1781-1789.

Seeger W, Walter H, Suttorp N, Muhly M, Bhakdi S. Thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage evoked by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in rabbit lungs. *J Clin Invest.* **1989b**;84(1):220-227.

Seeger W, Wolf H, Stähler G, Neuhof H, Roka L. Increased pulmonary vascular resistance and permeability due to arachidonate metabolism in isolated rabbit lungs. *Prostaglandins.* **1982**;23:157-173.

Seibert K, Masferrer JL, Needleman P, Salvemini D. Pharmacological manipulation of cyclo-oxygenase-2 in the inflamed hydronephrotic kidney. *Br J Pharmacol.* **1996**;117(6):1016-20.

Seo HS, Michalek SM, Nahm MH. Lipoteichoic acid is important in innate immune responses to gram-positive bacteria. *Infect Immun.* **2008**;76(1):206-213.

Serfilippi G, Ferro TJ, Johnson A. Activation of protein kinase C mediates altered pulmonary vasoreactivity induced by tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol.* **1994**;267(3 Pt 1):L282-90.

Serikov VB, Choi H, Schmiel K, Skaggs C, Fleming NW, Wu R, Widdicombe JH. Endotoxin induces leukocyte transmigration and changes in permeability of the airway epithelium via protein-kinase C and extracellular regulated kinase activation. *J Endotoxin Res.* **2004**;10(1):55-65.

Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med.* **1990**;171:35-47.

Shapira L, Sylvia VL, Halabi A, Soskolne WA, van Dyke TA, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Bacterial lipopolysaccharide induces early and late activation of protein kinase C in inflammatory macrophages by selective activation of PKC ϵ . *Biochem Biophys Res Commun.* **1997**;240:629-634.

Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S, Van Dyke TE. Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1 β production in human monocytes. *J Immunol.* **1994**;153:1818-1824.

Shen KP, Liou SF, Hsieh SL, Chen IJ, Wu BN. Eugenosedin-A amelioration of lipopolysaccharide-induced up-regulation of p38 MAPK, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2. *J Pharm Pharmacol.* **2007**;59(6):879-889.

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

Shinji H, Akagawa KS, Yoshida T. LPS induces selective translocation of protein kinase C-beta in LPS-responsive mouse macrophages, but not in LPS-nonresponsive mouse macrophages. *J Immunol.* **1994**;153(12):5760-5771.

Shore SA, Austen KF, Drazen JM. Eicosanoids and the lung. In *Lung Cell Biology*, edited by D. Massaro New York: Dekker. **1989**;4:1012-1089.

Simons RK, Maier RV, Chi EY. Pulmonary effects of continuous endotoxin infusion in the rat. *Circ Shock.* **1991**;33(4):233-243.

Smith EF. Thromboxane A2 in cardiovascular and renal disorders: is there a defined role for thromboxane receptor antagonists or thromboxane synthase inhibitors? *Eicosanoids.* **1989**;2(4):199-212.

Smith M, Gunther R, Zaiss C, Flynn J, Demling R. Pulmonary microvascular injury from lipoxygenase infusion: comparison with endotoxemia. *Circ Shock.* **1981**;8(6):647-656.

Snipes JA, Kis B, Shelness GS, Hewett JA, Busija DW. Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative Cox-3) in rat. *J Pharmacol Exp Ther.* **2005**;313:668-676.

Spannhake EW, Lemen RJ, Wegmann MJ, Hyman AI, Kadowitz PJ. Effects of arachidonic acid and prostaglandins on lung function in the intact dog. *J Appl Physiol.* **1978**;44:394-405.

St-Denis A, Chano F, Tremblay P, St-Pierre Y, Descoteaux A. Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem.* **1998**;273(49):32787-32792.

Stempka L, Girod A, Müller HJ, Rincke G, Marks F, Gschwendt M, Bossemeyer D. Phosphorylation of protein kinase Cdelta (PKCdelta) at threonine 505 is not a prerequisite for enzymatic activity. Expression of rat PKCdelta and an alanine 505 mutant in bacteria in a functional form. *J Biol Chem.* **1997**;272(10):6805-6811.

Studel W, Krämer HJ, Degner D, Rosseau S, Schütte H, Walmrath D, Seeger W. Endotoxin priming of thromboxane-related vasoconstrictor responses in perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol.* **1997**;83(1):18-24.

Sutherland IW. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol.* **1985**;39:243-270.

Suttorp N, Galanos C, Neuhof H. Endotoxin alters arachidonate metabolism in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol.* **1987**;253:C384-C390.

Sweet MJ, Hume DA. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol.* **1996**;60(1):8-26.

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2004**;101(10):3516-3521.

Takada H, Uehara A. Enhancement of TLR-mediated innate immune responses by peptidoglycans through NOD signaling. *Curr Pharm Des.* **2006**;12(32):4163-4172.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* **1999**;11(4):443-451.

Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol.* **2001**;13(7):933-940.

Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. **2000**;12(1):113-117.

Tasken K, Skalhegg BS, Solberg R, Andersson KB, Taylor SS, Lea T, Blomhoff HK, Jahnsen T, Hansson V. Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. *J Biol Chem.* **1993**;268(28):21276-21283.

Taylor SS, Radzio-Andzelm E, Hunter T. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J.* **1995**;9(13):1255-1266.

Timmerman CP, Mattsson E, Martinez-Martinez L, De Graaf L, Van Strijp JA, Verbrugh HA, Verhoef J, Fleer A. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infect Immun.* **1993**;61(10):4167-4172.

Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem.* **1995**;270:10482-10488.

Todd RF, Petty HR. β_2 (CD11/CD18) integrins can serve as signaling partners for other leukocyte receptors. *J Lab Clin Med.* **1997**;129(5):492-498.

Togashi Y, Yamaki K, Sakai T, Watanabe-Kobayashi M, Mue S, Ohuchi K. Analysis of the expression of intercellular adhesion molecule-1 in cells of the human bronchial epithelial cell line NCI-H292. *Eur J Pharmacol.* **1998**;345(2):199-206.

Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem.* **1991**;266(24):15771-15781.

Triantafilou M, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, Triantafilou K. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem.* **2006**;281(41):31002-31011.

Uhlig S, Featherstone RL, Held HD, Nüsing R, Schudt C, Wendel A. Attenuation by phosphodiesterase inhibitors of lipopolysaccharide-induced thromboxane release and bronchoconstriction in rat lungs. *J Pharmacol Exp Ther.* **1997**;283:1453-1459.

Ulevitch RJ. Recognition of bacterial endotoxin in biologic systems. *Lab Invest.* **1991**;65(2):121-122.

Ullrich R, Bloch KD, Ichinose F, Steudel W, Zapol WM. Hypoxic pulmonary blood flow redistribution and arterial oxygenation in endotoxin-challenged NOS2-deficient mice. *J Clin Invest.* **1999**;104:1421-1429.

Ullrich R, Roeder G, Lorber C, Quezado ZM, Kneifel W, Gasser H, Schlag G, Redl H, Germann P. Continuous venovenous hemofiltration improves arterial oxygenation in endotoxin-induced lung injury in pigs. *Anesthesiology.* **2001**;95(2):428-436.

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor-2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* **1999**;401:811-815.

Valledor AF, Xaus J, Comalada M, Soler C, Celada A. Protein kinase C ϵ is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol.* **2000**;164:29-37.

Viinikka L, Ylikorkala O. Measurement of thromboxane B2 in human plasma or serum by radioimmunoassay. *Prostaglandins.* **1980**;20(4):759-766.

Vollmer W, Höltje JV. The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J Bacteriol.* **2004**;186(18):5978-5987.

Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ, Burke JF, Dinarello CA. Staphylococcus epidermidis induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to Escherichia coli. *J Clin Invest.* **1991**;87(6):1925-1935.

Walaas SI, Greengard P. Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacol Rev.* **1991**;43(3):299-349.

Walch L, de Montpreville V, Brink C, Norel X. Prostanoid EP(1)- and TP-receptors involved in the contraction of human pulmonary veins. *Br J Pharmacol.* **2001**;134(8):1671-1678 .

Walmrath D, Ghofrani HA, Grimminger F, Seeger W. Synergism of alveolar endotoxin "priming" and intravascular exotoxin challenge in lung injury. *Am J Crit Care Med.* **1996**;154:460-468.

Walmrath D, Ghofrani HA, Rosseau S, Schütte H, Cramer A, Kaddus W, Grimminger F, Bhakdi S, 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.* **1994a**;180:1437-1443.

Walmrath D, Griebner M, Kolb B, Grimminger F, Gallanos C, Schade U, Seeger W. Endotoxin primes perfused rabbit lungs for enhanced vasoconstrictor response to staphylococcal alpha-toxin. *Am Rev Respir Dis.* **1993**;148:1179-1183.

Walmrath D, Pilch J, Scharmann M, Grimminger F, Seeger W. Severe V_A/Q mismatch in perfused lungs evoked by sequential challenge with endotoxin and *E. coli* hemolysin. *J Appl Physiol.* **1994b**;76:1020-1030.

Walters EH, O'Byrne PM, Fabbri LM, Graf PD, Holtzman MJ, Nadel JA. Control of neurotransmission by prostaglandins in canine trachealis muscle. *J Appl Physiol.* **1984**;57(1):129-134.

Wang D, Yu X, Brecher P. Nitric oxide and N-acetylcysteine inhibit the activation of mitogen-activated protein kinases by angiotensin II in rat cardiac fibroblasts. *J Biol Chem.* **1998**;273(49):33027-33034.

Wang Q, Dziarski R, Kirschning CJ, Muzio M, Gupta D. Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-->MyD88-->IRAK-->TRAF-->NIK-->IKK-->NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect Immun.* **2001**;69(4):2270-2276.

Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* **2000**;342(18):1334-1349.

Weidemann B, Schletter J, Dziarski R, Kusumoto S, Stelter F, Rietschel ET, Flad HD, Ulmer AJ. Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. *Infect Immun.* **1997**;65(3):858-864.

Weinstein SI, Sanghera JS, Lemke K, DeFranco AL, Pelech SL. Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J Biol Chem.* **1992**;267:14955-14962.

Wenzel-Seifert K, Schächtele C, Seifert R. N-protein kinase C isoenzymes may be involved in the regulation of various neutrophil functions. *Biochem Biophys Res Commun.* **1994**;200(3):1536-1543.

Wolf HR, Seeger HW. Experimental and clinical results in shock lung treatment with vitamin E. *Ann N Y Acad Sci.* **1982**;393:392-410.

Weir EK, Mlczech J, Reeves JT, Grover RF. Endotoxin and prevention of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Lab Clin Med.* **1976**;88(6):975-983.

Wilkinson SE, Parker PJ, Nixon JS. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem J.* **1993**;294:335-337.

Wray GM, Millar CG, Hinds CJ, Thiemermann C. Selective inhibition of the activity of inducible nitric oxide synthase prevents the circulatory failure, but not the organ injury/dysfunction, caused by endotoxin. *Shock.* **1998**;9(5):329-335.

Wright SD, Detmers PA, Aida Y, Adamowski R, Anderson DC, Chad Z, Kabbash LG, Pabst MJ. CD18-deficient cells respond to lipopolysaccharide in vitro. *J Immunol.* **1990a**;144(7):2566-2571.

Wright SD, Jong MTC. Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide. *J Exp Med.* **1986**;164(6):1876-1888.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* **1990b**;249:1431-1433.

Wright SD, Tobias PS, Ulevitch RJ, Ramos RA. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med.* **1989**;170(4):1231-1241.

Wu HL, Nambi P. Transforming growth factor-beta-mediated proliferation of renal tubular epithelial cells involves pertussis toxin-sensitive G protein-and protein kinase C-dependent pathways. *Pharmacology.* **1998**;57(1):8-12.

Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med.* **1994**;180(3):1025-1035.

Wurfel MM, Monks GB, Ingalls RR, Dedrick RL, Delude R, Zough DH, Lamping N, Schumann RR, Thieringer R, Fenton MJ, Wright SD, Golenbock D. Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact. *J Exp Med.* **1997**;186(12):2051-2056.

Yamamoto M, Acevedo-Duncan M, Chalfant CE, Patel NA, Watson JE, Cooper DR. The roles of protein kinase C beta I and beta II in vascular smooth muscle cell proliferation. *Exp Cell Res.* **1998**;240(2):349-358.

Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow JC. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated Toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem.* **2000**;275:20861-20866.

Yang S, Tamai R, Akashi S, Takeuchi O, Akira S, Sugawara S, Takada H. Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect Immun.* **2001a**;69(4):2045-2053.

Yang ZW, Wang J, Zheng T, Altura BT, Altura BM. Importance of PKC and PI3Ks in ethanol-induced contraction of cerebral arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2001b**; 80(5):H2144-52..

Ylikorkala O, Mäkilä UM. Prostacyclin and thromboxane in gynecology and obstetrics. *Am J Obstet Gynecol.* **1985**;152(3):318-329.

Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol.* **1999**;163(1):1-5.

Young PR, McLaughlin MM, Kumar S, Kassis S, Doyle ML, McNulty D, Gallagher TF, Fisher S, McDonnell PC, Carr SA, Huddleston MJ, Seibel G, Porter TG, Livi GP, Adams JL, Lee JC. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem.* **1997**;272(18):12116-12121.

Zambon M, Vincent JL. Mortality rates for patients with ALI/ARDS have decreased over time. *Chest.* Epub **2008** Feb 8.

Zarewych DM, Kindzelskii AL, Todd RF, Petty HR. LPS induces CD14 association with complement receptor type 3 which is reversed by neutrophil adhesion. *J Immunol.* **1996**;156(2):430-433.

Zhang YH, Lin JX, Vilcek J. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**;90(21):10193-10197.

Zheng WH, Kar S, Quirion R. Stimulation of protein kinase C modulates insulin-like growth factor-1-induced akt activation in PC12 cells. *J Biol Chem.* **2000**;275(18):13377-13385.

9. ANHANG

9.1. Tabellen

	Δ PAP, mmHg	Δ VP, mmHg	Δ W, g
Kontrolle Zeitpunkt 0-120	0.86 \pm 0.22	0.02 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02
Kontrolle Zeitpunkt 125	3.88 \pm 0.15***	0.14 \pm 0.04*	0.63 \pm 0.17**

Tabelle 2a: Wirkung der AA-Applikation zum Zeitpunkt 120 min auf den Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Δ PAP), Ventilationsdruckes (Δ VP) und Lungengewichtes (Δ W) bis zum Zeitpunkt 125 min.

Die Lungen wurden ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle perfundiert. Nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die zwischen dem Zeitpunkt 0 und 120 min und die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Signifikante Unterschiede der Messwertveränderungen der Kontrolllungen zwischen dem Zeitpunkt 0 und 120 zu den Messwertveränderungen zum Zeitpunkt 125 min: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

	Δ PAP 0-120 min, mmHg
Kontrolle	0.86 \pm 0.22
10 μ g/ml LPS	0.46 \pm 0.13
10 μ g/ml LTA	0.43 \pm 0.17
20 μ g/ml LTA	0.48 \pm 0.12
20 μ g/ml PepG	1.98 \pm 0.24**
50 μ g/ml PepG	1.74 \pm 0.43
10 μ g/ml LTA + PepG	1.43 \pm 0.18
20 μ g/ml LTA + PepG	2.34 \pm 0.24**

Tabelle 2b: Einfluss des "Primings" durch Bakterienwandbestandteile auf den Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Δ PAP) zwischen den Zeitpunkten 0 und 120 min.

Die Lungen wurden ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle und in Anwesenheit von 10 μ g/ml LPS, 10 und 20 μ g/ml LTA, 20 und 50 μ g/ml PepG, sowie 10 μ g/ml LTA zusammen mit 10 μ g/ml PepG und 20 μ g/ml LTA zusammen mit 20 μ g/ml PepG perfundiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die zwischen dem Zeitpunkt 0 und 120 min aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: ** p<0.01.

	TXB ₂ , pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} , pg/ml
Kontrolle	60.4 ± 21.9	234.0 ± 71.2	1910.0 ± 111.8
10 µg/ml LPS	187.0 ± 33.2*	462.8 ± 148.4	5410.0 ± 506.1***
10 µg/ml LTA	73.1 ± 39.2	231.0 ± 36.5	4967.0 ± 2112.0
20 µg/ml LTA	139.7 ± 60.7	161.0 ± 42.6	3540.0 ± 787.8
20 µg/ml PepG	47.3 ± 14.9	220.2 ± 18.3	2736.0 ± 299.4*
50 µg/ml PepG	197.9 ± 47.4*	335.7 ± 95.8	2405.0 ± 701.6
10 µg/ml LTA + PepG	214.0 ± 71.6	190.6 ± 28.5	3107.0 ± 422.6*
20 µg/ml LTA + PepG	163.7 ± 33.5*	318.6 ± 27.5	6611.0 ± 498.4***

Tabelle 2c: Einfluss des “Primings“ durch Bakterienwandbestandteile auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} bis zum Zeitpunkt 120 min.

Die Lungen wurden ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle und in Anwesenheit von 10 µg/ml LPS, 10 und 20 µg/ml LTA, 20 und 50 µg/ml PepG, sowie 10 µg/ml LTA zusammen mit 10 µg/ml PepG und 20 µg/ml LTA zusammen mit 20 µg/ml PepG perfundiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehaltes zum Zeitpunkt 120 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0.05, *** p<0.001.

	ΔPAP, mmHg	ΔVP, mmHg	ΔW, g
Kontrolle	3.88 ± 0.15	0.14 ± 0.04	0.63 ± 0.17
10 µg/ml LPS	10.82 ± 0.22***	1.48 ± 0.24***	4.78 ± 1.07**
10 µg/ml LTA	4.43 ± 0.53	0.34 ± 0.10	0.90 ± 0.31
20 µg/ml LTA	8.36 ± 1.76*	0.79 ± 0.15**	4.79 ± 2.14
20 µg/ml PepG	6.28 ± 0.59**	0.42 ± 0.10*	2.40 ± 0.45**
50 µg/ml PepG	5.20 ± 0.49*	0.52 ± 0.13*	1.37 ± 0.59
10 µg/ml LTA + PepG	9.68 ± 1.61**	0.95 ± 0.24*	6.03 ± 2.13*
20 µg/ml LTA + PepG	13.26 ± 0.70***	1.82 ± 0.33***	11.77 ± 0.80***

Tabelle 2d: Einfluss des “Primings“ durch Bakterienwandbestandteile auf den Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (ΔPAP), Ventilationsdruckes (ΔVP) und Lungengewichtes (ΔW) nach AA-Applikation.

Die Lungen wurden ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle und in Anwesenheit von 10 µg/ml LPS, 10 und 20 µg/ml LTA, 20 und 50 µg/ml PepG, sowie 10 µg/ml LTA zusammen mit 10 µg/ml PepG und 20 µg/ml LTA zusammen mit 20 µg/ml PepG perfundiert. Nach 2 h wurde AA (10 µmol/l) dem Perfusat zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

	TXB ₂ , pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} , pg/ml
Kontrolle	2220.0 ± 543.1	871.0 ± 209.8	22020.0 ± 6154.0
10 µg/ml LPS	7010.0 ± 1094.0**	4048.0 ± 1282.0*	60870.0 ± 6860.0**
10 µg/ml LTA	4287.0 ± 851.3	2030.0 ± 713.9	52150.0 ± 6053.0*
20 µg/ml LTA	4830.0 ± 684.8*	2494.0 ± 333.1**	35140.0 ± 7139.0
20 µg/ml PepG	3924.0 ± 853.4	1886.0 ± 172.2**	50350.0 ± 8409.0*
50 µg/ml PepG	6421.0 ± 1013.0**	3949.0 ± 1103.0*	43440.0 ± 18040.0
10 µg/ml LTA + PepG	5699.0 ± 722.8**	3693.0 ± 245.2***	35880.0 ± 9854.0
20 µg/ml LTA + PepG	4431.0 ± 742.0*	3707.0 ± 221.9***	93590.0 ± 1988.0***

Tabelle 2e: Einfluss des "Primings" durch Bakterienwandbestandteile auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} nach AA-Applikation.

Die Lungen wurden ohne Stimulation durch Bakterienwandbestandteile als Kontrolle und in Anwesenheit von 10 µg/ml LPS, 10 und 20 µg/ml LTA, 20 und 50 µg/ml PepG, sowie 10 µg/ml LTA zusammen mit 10 µg/ml PepG und 20 µg/ml LTA zusammen mit 20 µg/ml PepG perfundiert. Nach 2 h wurde AA (10 µmol/l) dem Perfusat zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehaltes zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede der durch Bakterienwandbestandteile stimulierten Lungen zu den Kontrolllungen: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

	ΔPAP, mmHg	ΔVP, mmHg	ΔW, g
10 µg/ml LPS	10.82 ± 0.22	1.48 ± 0.24	4.78 ± 1.07
100 nM H-89 bei 0 min	8.20 ± 1.04	1.35 ± 0.29	6.07 ± 1.45
100 nM H-89 bei 60 min	8.01 ± 1.33	0.75 ± 0.25	4.47 ± 1.83

Tabelle 3a: Wirkung des "gramnegativen Primings" auf den AA-induzierten Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (ΔPAP), Ventilationsdruckes (ΔVP) und Lungengewichtes (ΔW) in Abwesenheit und Anwesenheit eines PKA-Inhibitors.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 10 µg/ml LPS perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 µmol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe des PKA-Inhibitors H-89 erfolgte zum Zeitpunkt 0 bzw. 60 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe.

	TXB ₂ , pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} , pg/ml
10 µg/ml LPS	7010.0 ± 1094.0	4048.0 ± 1282.0	60870.0 ± 6860.0
100 nM H-89 bei 60 min	5796.0 ± 654.0	4285.0 ± 561.9	65200.0 ± 7496.0

Tabelle 3b: Einfluss des "gramnegativen Primings" auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} nach AA-Applikation in Abwesenheit und Anwesenheit eines PKA-Inhibitors.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 10 µg/ml LPS perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 µmol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe des PKA-Inhibitors H-89 erfolgte zum Zeitpunkt 60 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM des Metabolitengehaltes im rezirkulierenden Perfusat in pg/ml zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe.

	Δ PAP, mmHg	Δ VP, mmHg	Δ W, g
10 μ g/ml LPS	10.82 \pm 0.22	1.48 \pm 0.24	4.78 \pm 1.07
50 nM Gö 6976	7.20 \pm 1.17*	0.87 \pm 0.21	1.94 \pm 0.53*
10 μ M PKC β_{C2-4} -Inhibitor	5.62 \pm 1.22**	0.80 \pm 0.27	1.22 \pm 0.50*
50 nM Ro-31-8425	3.94 \pm 1.05***	0.77 \pm 0.16*	0.95 \pm 0.51*
10 μ M Ro-32-0432	3.98 \pm 0.90***	0.78 \pm 0.10*	0.64 \pm 0.17*
50 nM Bisindolylmaleimid I	3.58 \pm 1.16***	0.29 \pm 0.13**	1.00 \pm 0.35*
20 μ M Gö 6983	3.45 \pm 0.17***	0.32 \pm 0.04**	0.88 \pm 0.07*

Tabelle 4a: Wirkung des "gramnegativen Primings" auf den AA-induzierten Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Δ PAP), Ventilationsdruckes (Δ VP) und Lungengewichtes (Δ W) in Abwesenheit und Anwesenheit von PKC-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 10 μ g/ml LPS perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der PKC-Inhibitoren Gö 6976, Myristoylierter PKC β_{C2-4} -Inhibitor, Ro-31-8425, Ro-32-0432, Bisindolylmaleimid I und Gö 6983 erfolgte zum Zeitpunkt 0 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LPS stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

	TXB ₂ , pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} , pg/ml
10 μ g/ml LPS	7010.0 \pm 1094.0	4048.0 \pm 1282.0	60870.0 \pm 6860.0
50 nM Gö 6976	4649.0 \pm 449.0*	3236.0 \pm 794.5	43000.0 \pm 4661.0*
10 μ M PKC β_{C2-4} -Inhibitor	5819.0 \pm 764.5	4355.0 \pm 1460.0	62990.0 \pm 10820.0
50 nM Ro-31-8425	8056.0 \pm 1511.0	6494.0 \pm 1699.0	90520.0 \pm 19220.0
10 μ M Ro-32-0432	7573.0 \pm 737.3	2630.0 \pm 958.0	48500.0 \pm 7182.0
50 nM Bisindolylmaleimid I	4105.0 \pm 808.1	3853.0 \pm 670.0	69210.0 \pm 14640.0
20 μ M Gö 6983	7459.0 \pm 533.9	4439.0 \pm 690.9	85490.0 \pm 18590.0

Tabelle 4b: Einfluss des "gramnegativen Primings" auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1 α} nach AA-Applikation in Abwesenheit und Anwesenheit von PKC-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 10 μ g/ml LPS perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der PKC-Inhibitoren Gö 6976, Myristoylierter PKC β_{C2-4} -Inhibitor, Ro-31-8425, Ro-32-0432, Bisindolylmaleimid I und Gö 6983 erfolgte zum Zeitpunkt 0 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM des Metabolitengehaltes im rezirkulierenden Perfusat in pg/ml zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LPS stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * p<0.05.

	Δ PAP, mmHg	Δ VP, mmHg	Δ W, g
20 μ g/ml LTA + PepG	13.26 \pm 0.7	1.82 \pm 0.33	11.77 \pm 0.80
50 nM Bisindolylmaleimid I	5.88 \pm 0.96***	0.73 \pm 0.25*	1.34 \pm 0.49***
50 nM Gö 6976	4.78 \pm 0.79***	0.60 \pm 0.09**	1.06 \pm 0.30***
20 μ M Gö 6983	1.95 \pm 0.89***	0.43 \pm 0.13**	0.29 \pm 0.07***

Tabelle 5a: Wirkung des "grampositiven Primings" auf den AA-induzierten Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Δ PAP), Ventilationsdruckes (Δ VP) und Lungengewichtes (Δ W) in Abwesenheit und Anwesenheit von PKC-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 μ g/ml LTA und 20 μ g/ml PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I, Gö 6976 und Gö 6983 erfolgte zum Zeitpunkt 0 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

	TXB ₂ , pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} , pg/ml
20 μ g/ml LTA + PepG	4431.0 \pm 742.0	3707.0 \pm 221.9	93590.0 \pm 1988.0
50 nM Bisindolylmaleimid I	3571.0 \pm 1443.0	3315.0 \pm 1057.0	45330.0 \pm 8397.0***
50 nM Gö 6976	5731.0 \pm 1220.0	3691.0 \pm 465.1	51510.0 \pm 5604.0***
20 μ M Gö 6983	10590.0 \pm 2294.0*	6582.0 \pm 2367.0	100300.0 \pm 1622.0

Tabelle 5b: Einfluss des "grampositiven Primings" auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1 α} nach AA-Applikation in Abwesenheit und Anwesenheit von PKC-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 μ g/ml LTA und 20 μ g/ml PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I, Gö 6976 und Gö 6983 erfolgte zum Zeitpunkt 0 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM des Metabolitengehaltes im rezirkulierenden Perfusat in pg/ml zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * p<0.05, *** p<0.001.

	Δ PAP, mmHg	Δ VP, mmHg	Δ W, g
20 μ g/ml LTA + PepG	13.26 \pm 0.7	1.82 \pm 0.33	11.77 \pm 0.80
10 μ M SB-203580	0.55 \pm 0.25***	0.04 \pm 0.02***	0.07 \pm 0.02***
20 μ M UO126	3.96 \pm 0.53***	0.22 \pm 0.06**	0.68 \pm 0.19***

Tabelle 6a: Wirkung des "grampositiven Primings" auf den AA-induzierten Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Δ PAP), Ventilationsdruckes (Δ VP) und Lungengewichtes (Δ W) in Abwesenheit und Anwesenheit von MAPK-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 μ g/ml LTA und 20 μ g/ml PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe des p38-MAPK-Inhibitors SB-203580 und des ERK1/2-Inhibitors UO126 erfolgte zum Zeitpunkt 60 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: ** p<0.01, *** p<0.001.

	TXB ₂ , pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} , pg/ml
20 μ g/ml LTA + PepG	4431.0 \pm 742.0	3707.0 \pm 221.9	93590.0 \pm 1988.0
10 μ M SB-203580	424.0 \pm 195.4***	1076.0 \pm 162.1***	33020.0 \pm 8330.0***
20 μ M UO126	2925.0 \pm 325.5*	2813.0 \pm 313.3*	107700.0 \pm 16260.0

Tabelle 6b: Einfluss des "grampositiven Primings" auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1 α} nach AA-Applikation in Abwesenheit und Anwesenheit von MAPK-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 μ g/ml LTA und 20 μ g/ml PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe des p38-MAPK-Inhibitors SB-203580 und des ERK1/2-Inhibitors UO126 erfolgte zum Zeitpunkt 60 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM des Metabolitengehaltes im rezirkulierenden Perfusat in pg/ml zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * p<0.05, *** p<0.001.

	Δ PAP, mmHg	Δ VP, mmHg	Δ W, g
20 μ g/ml LTA + PepG	13.26 \pm 0.7	1.82 \pm 0.33	11.77 \pm 0.80
25 μ M NS-398	2.76 \pm 0.57***	0.70 \pm 0.18*	0.37 \pm 0.12***
10 μ M SC-236	1.50 \pm 0.25***	0.36 \pm 0.06**	0.23 \pm 0.06***
25 μ M DUP-697	0.02 \pm 0.02***	0.02 \pm 0.02***	0.10 \pm 0.03***

Tabelle 7a: Wirkung des "grampositiven Primings" auf den AA-induzierten Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Δ PAP), Ventilationsdruckes (Δ VP) und Lungengewichtes (Δ W) in Abwesenheit und Anwesenheit von Cox-2-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 μ g/ml LTA und 20 μ g/ml PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der Cox-2-Inhibitoren NS-398, SC-236 und DUP-697 erfolgte zum Zeitpunkt 110 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Messwertveränderungen, die innerhalb von 5 min nach AA-Gabe aufgetreten sind. n = 5 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

	TXB ₂ , pg/ml	PGE ₂ , pg/ml	6-keto-PGF _{1α} , pg/ml
20 μ g/ml LTA + PepG	4431.0 \pm 742.0	3707.0 \pm 221.9	93590.0 \pm 1988.0
25 μ M NS-398	2317.0 \pm 398.8**	1097.0 \pm 196.6***	46600.0 \pm 5893.0***
10 μ M SC-236	424.0 \pm 677.0***	999.4 \pm 203.6***	52450.0 \pm 11480.0**
25 μ M DUP-697	208.4 \pm 18.0***	443.4 \pm 129.5***	17520.0 \pm 2091.0***

Tabelle 7b: Einfluss des "grampositiven Primings" auf die AA-Metabolite TXB₂, PGE₂ und 6-keto-PGF_{1 α} nach AA-Applikation in Abwesenheit und Anwesenheit von Cox-2-Inhibitoren.

Die Lungen wurden in Anwesenheit von 20 μ g/ml LTA und 20 μ g/ml PepG perfundiert und nach 2 h wurde AA (10 μ mol/l) dem Perfusat zugefügt. Die Gabe der Cox-2-Inhibitoren NS-398, SC-236 und DUP-697 erfolgte zum Zeitpunkt 110 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM des Metabolitengehaltes im rezirkulierenden Perfusat in pg/ml zum Zeitpunkt 125 min. n = 5 Probenanalysen von jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeder Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zu den mit LTA und PepG stimulierten Lungen, die ohne Inhibitor perfundiert wurden: ** p<0.01, *** p<0.001.

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Personen, die an der Entstehung und Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren und mich mit Rat und Tat unterstützten.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Leander Ermert für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung. Bei Frau Dr. Monika Ermert bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger danke ich sehr für seine Bereitschaft, die extern durchgeführte Arbeit vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zu vertreten.

Bei den Mitarbeitern des Sonderforschungsbereichs 547 der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Seeger bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre während meiner Forschungsarbeiten.

Mein Dank gilt hier insbesondere Frau Karin Quantz für die Unterstützung bei der Beschaffung der benötigten Arbeitsmaterialien und ihre freundliche Hilfe beim Umgang mit diesen sowie Herrn Nils Eisenhardt für die Einweisung in die praktischen Arbeiten der Versuchsdurchführung und die Analysemethoden.

Ferner danke ich Herrn Christian Dirkes für die Hilfe bei der Anwendung des Statistikprogrammes.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht und mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zum Abschluss danke ich meinen Freunden für ihr Verständnis gegenüber meiner Arbeit und ihre Geduld bei der Fertigstellung der Dissertation.

11. ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5261-7

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



9 17 8 3 8 3 5 19 5 2 6 1 4 1