

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

**Die Bedeutung des Adenosinrezeptors A1 für die LPS-  
induzierte akute pulmonale Inflammation**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Kristian-Christos Ngamsri**

**aus  
Köln**

**2013**

Dekan:

Professor Dr. I. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. J. Reutershan

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H.-G. Rammensee

3. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Thiel

Für Helga, Ava und meine Familie

## **Inhalt**

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung .....	1
1.1	Einleitung .....	1
1.2	Wissenschaftliche Fragestellung .....	8
2	Material .....	9
2.1	Anästhesie .....	9
2.2	RT-PCR.....	9
2.3	Western Blot.....	11
2.4	In vivo Transmigration .....	12
2.5	Mikrovaskuläre Permeabilität .....	14
2.6	BCA Proteinbestimmung.....	14
2.7	ELISA .....	15
2.8	Immunhistochemie .....	15
2.9	PMN-Isolation und Transmigrationsassay.....	17
2.10	Zytoskelettales Remodelling .....	18
2.11	Antikörper.....	19
2.12	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	21
2.13	Software.....	24
3	Methoden .....	25
3.1	Anästhesie .....	25
3.2	Mausstämme und Zelllinien.....	25
3.3	Herstellung von chimären Mäusen.....	26
3.3.1	Durchführung.....	26
3.4	RT-PCR.....	28
3.4.1	Einleitung.....	28
3.4.2	Durchführung.....	28
3.5	Western Blot.....	30

3.5.1	Einleitung.....	30
3.5.2	Durchführung.....	30
3.6	Differentialblutbild.....	31
3.6.2	Durchführung.....	32
3.7	Depletion von neutrophilen Granulozyten .....	33
3.8	ARDS-Modell .....	34
3.9	Migration neutrophiler Granulozyten in den Lungekompartimenten ....	35
3.9.1	Einleitung.....	35
3.9.2	Durchführung.....	35
3.10	Durchflusszytometrie .....	38
3.10.1	Einleitung.....	38
3.10.2	Durchführung.....	40
3.11	Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität.....	40
3.11.1	Einleitung.....	40
3.11.2	Durchführung.....	41
3.12	BCA-Proteinbestimmung.....	42
3.12.1	Einleitung.....	42
3.12.2	Durchführung.....	42
3.13	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) .....	42
3.13.1	Einleitung.....	42
3.13.2	Durchführung.....	43
3.14	Immunhistochemie.....	43
3.14.1	Lungenpräparation .....	43
3.14.2	Immunhistochemische Färbung von Lungenpräparaten .....	45
3.15	In vitro-Transmigration von neutrophilen Granulozyten.....	47
3.15.1	Einleitung.....	47
3.15.2	Isolation von neutrophilen Granulozyten .....	47
3.15.3	Vorbereitungen für die in vitro-Transmigration .....	49
3.15.4	Messung.....	49
3.16	Aktinzytoskelettales Remodelling.....	50
3.16.1	Einleitung.....	50
3.16.2	Durchführung.....	50

3.17	Statistik .....	51
4	Ergebnisse .....	52
4.1	Differentialblutbild.....	52
4.2	LPS-bedingte Steigerung der A1AR mRNA und Protein-Expression ..	52
4.3	LPS-bedingte Migration neutrophiler Granulozyten in die Lungenkompartimente von Wildtyp- und A1AR <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	56
4.4	Pharmakologische Aktivierung von Adenosinrezeptor A1 reduziert die LPS-bedingte Migration neutrophiler Granulozyten in der Lunge .....	58
4.5	A1AR-Aktivierung reduziert die LPS-bedingte Steigerung der mikrovaskulären Permeabilität.....	61
4.6	Reduktion inflammatorischer Chemokinen nach Behandlung mit 2'Me-CCPA.....	63
4.7	Immunhistochemische Veränderungen bei A1AR Knockout-Mäusen .	65
4.8	Die Effekte von 2'Me-CCPA bei der PMN-Migration bei chimären Mäusen .....	66
4.9	Modulation von A1AR in in vitro-Transmigration humaner PMNs .....	69
4.10	Pharmakologische Modulation von A1AR-induzierten zytoskelettalen Veränderungen .....	72
4.11	2'Me-CCPA reduziert die LPS-bedingte Ausbildung von Sauerstoffradikalen humaner PMNs .....	75
5	Diskussion.....	76
6	Zusammenfassung.....	80
7	Literaturverzeichnis .....	83
8	Veröffentlichungen .....	87
9	Danksagung .....	88
10	Lebenslauf.....	89

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung von extrazellulärem Adenosin .....	3
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Knochenmarks-Transplantation zur Herstellung von chimären Mäusen .....	27
Abbildung 3: Aufbau der LPS-Verneblung.....	34
Abbildung 4: Durchflusszytometrische Bestimmung der LPS-bedingten PMN-Migration in der BAL.....	39
Abbildung 5: Quantifizierung von PMNs in der BAL und Lunge. ....	40
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Isolation neutrophiler Granulozyten .....	48
Abbildung 7: Schematische Darstellung der in vitro Transmigration von PMNs .....	50
Abbildung 8: LPS-induzierte A1AR mRNA und Proteinexpression in WT- und A1AR <sup>-/-</sup> -Mauslungen .....	55
Abbildung 9: Erhöhte PMN Akkumulation bei A1-gendefiziente Mäusen nach LPS-Exposition.....	57
Abbildung 10: Modulation des A1AR reduziert die PMN Migration bei Wildtyp-Mäusen .....	59
Abbildung 11: Ausschluss unspezifischer Effekte des 2´Me-CCPA auf den Adenosinrezeptor A2b.....	60
Abbildung 12: Reduktion der Hyperpermeabilität durch 2´Me-CCPA.....	62
Abbildung 13: 2´Me-CCPA reduziert die Freisetzung inflammatorischer Chemokinen .....	64
Abbildung 14: Immunhistochemische Darstellung der PMN Infiltration in WT- und A1AR <sup>-/-</sup> -Mäusen nach LPS-Exposition.....	65
Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung der A1AR-Expression in Wildtyp- und A1AR <sup>-/-</sup> -Mauslungen .....	67
Abbildung 16: Einfluss von Adenosinrezeptor A1 bei chimären Mäuse.....	68
Abbildung 17: 2´Me-CCPA reduziert transendotheliale PMN-Migration .....	70
Abbildung 18: Inhibition der transepitheliale PMN-Migration durch 2´Me-CCPA .....	71

Abbildung 19: A1AR-Aktivierung reduziert LPS-bedingte F-Aktin Formation bei humane Endothelzellen (HMVEC-L) .....	73
Abbildung 20: A1AR-Aktivierung reduziert LPS-bedingte F-Aktin Formation bei humane Epithelzellen (A549) .....	74
Abbildung 21: 2'Me-CCPA reduziert die LPS-bedingten Bildung von Sauerstoffradikale .....	75



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Physiologische Funktionen der Adenosinrezeptoren.....	4
Tabelle 2: Färbungsmerkmale von Kernen, Zellorganellen und Granula von Leukozyten im Differentialblutbild.....	33
Tabelle 3: Markierungsprotokoll für fluoreszierende Antikörper für die BAL Flüssigkeit und Lunge .....	37
Tabelle 4: Einbettungsablauf für Entwässerung und Paraffinfiltration von Histologiepräparate .....	44
Tabelle 5: Rehydrierungsablauf von Histologiepräparaten.....	45
Tabelle 6: Dehydrierungsablauf von Histologie Präparaten .....	46
Tabelle 7: PMN-Zellzählung .....	48
Tabelle 8: Differentialblutbild von Wildtyp- (A1AR <sup>+/+</sup> ) und A1-Adenosinrezeptor Knockout-(A1AR <sup>-/-</sup> ) Mäuse .....	52

## Abkürzungsverzeichnis

A1AR	Adenosin Rezeptor A1
A2aAR	Adenosin Rezeptor A2a
A2bAR	Adenosin Rezeptor A2b
A549	Humane alveoläre Epithelzelllinie
ALI	Acute Lung Injury
ANOVA	Analysis of Variance
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Zyklisches Adenosin Monophosphat
CXCL1/KC	Keratinocyte-derived Chemokine
CXCL2/3/MiP-2	Macrophage inflammatory Protein-2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HCl	Salzsäure
HE	Hematoxylin-Eosin
HMEVC	Humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzelllinie
IL-6	Interleukin 6
KO	Knockout
NaCl	Natriumchlorid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMN	Polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

## 1.1 Einleitung

Das akute Atemnotsyndrom des Erwachsenen (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) stellt auch heute noch eine enorme Herausforderung in der Intensivmedizin dar und ist mit einer hohen Letalität und Morbidität verbunden (1). Definitionsgemäß besteht ein ARDS, wenn folgende klinische Kriterien erfüllt sind: akuter Beginn, bilaterale Lungeninfiltrate im Röntgen Thorax und eine schwere Hypoxämie entsprechend eines  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Quotienten (Horowitz-Index) von  $\leq 200$  mmHg ohne Hinweise auf eine relevante linkskardiale Funktionsstörung (PAWP, pulmonal-arterieller Verschlussdruck  $<18$  mmHg) (2). Ursachen des ARDS können direkte (Pneumonien, Aspiration) oder indirekte (Sepsis, schweres Polytrauma) Schädigungen der Lunge sein. Dabei kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion, die durch eine unkontrollierte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, Zerstörung der alveolokapillären Architektur und die Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren charakterisiert ist (3). Die Zerstörung der alveolokapillären Barriere führt zu einem interstitiellen und alveolären Ödem und letztlich zu einer Sauerstoffdiffusionsstörung und Hypoxämie (4).

Trotz zahlreicher Studien ist das bisherige Wissen über die Pathophysiologie der inflammatorischen Reaktion des ARDS lückenhaft, und es existieren keine kausalen Therapien. Aktuell beschränkt sich die intensivmedizinische Behandlung auf die Beatmung mit niedrigen Tidalvolumina (5), sowie weitere supportive Maßnahmen wie zum Beispiel der Lagerungstherapie (6).

Eine Schlüsselrolle in der akuten Phase des ARDS spielt die unkontrollierte Aktivierung neutrophiler Granulozyten (PMNs) und ihre Migration in die Lunge (7). Aktuelle Studien haben in verschiedenen ARDS-Modellen gezeigt, dass die Modulation der PMN-Einwanderung für den Verlauf und das Outcome eine entscheidende Rolle spielt (8). Dabei findet die Aktivierung und Migration von PMNs kaskadenartig statt und wird durch verschiedene inflammatorische Mediatoren reguliert. Zu Beginn der pulmonalen Inflammation kommt es zu einer Rekrutierung und Adhäsion von PMNs in den intrapulmonalen Gefäßen.

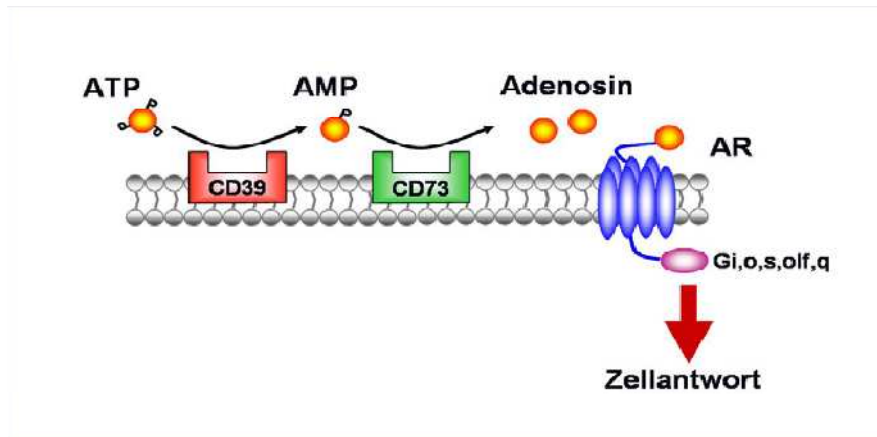
Durch transendotheliale und transepitheliale Migration findet eine PMN-Akkumulation in den verschiedenen Kompartimenten der Lunge (Interstitium und Alveolaraum) statt (9).

Wie wichtig die Rolle der PMNs im ARDS ist, zeigen klinische Studien, in denen eine Erhöhung der Leukozyten- und PMN-Zahlen mit einer schlechteren Prognose einhergeht (10). Des Weiteren korrelieren erhöhte Leukozytenzahlen im Blut mit einer erhöhten Mortalität von ARDS-Patienten (11).

Neben Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und weiteren intrazellulären Molekülen spielt extrazelluläres Adenosin eine entscheidende Rolle bei der PMN-Migration im Rahmen inflammatorischer Prozesse der Lunge (12).

Für unsere Studien haben wir ein etabliertes murines ARDS-Modell ausgewählt. Unsere Versuchstiere inhalierten in einer dafür speziell angefertigten Kammer Lipopolysaccharid (LPS). Die Inhalation von LPS führt zur einer pulmonalen Inflammation und induziert wesentliche Merkmale des akuten Atemnotsyndroms (9). LPS induziert die pulmonale Migration von PMNs, Steigerung der mikrovaskulären Permeabilität und die Ausschüttung von chemotaktischen Zytokinen. Des Weiteren können auch LPS-induzierte Schäden in der strukturellen Integrität der Lungenarchitektur beobachtet werden.

Extrazelluläres Adenosin entsteht durch die hydrolytische Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) in Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosin. Dieser Prozess wird durch die beiden membrangebundenen Enzyme Ectopyrase (CD39) und Ecto-5'-nukleotidase (CD73) katalysiert (13, 14) (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Entstehung von extrazellulärem Adenosin.**

*Sequentielle Bildung von Adenosin nach Abspaltung von Diphosphat und Phosphat von Adenosintriphosphat (ATP) unter Beteiligung von membrangebundenem CD39 und CD73. Das kurzlebige Adenosin bindet an die verschiedenen Adenosinrezeptoren, startet intrazelluläre Signalkaskaden und resultiert in spezifischen Zellantworten. Modifiziert nach (15).*

Vergangene Studien konnten bereits in Hypoxie- und durch maschinelle Ventilation induzierten ARDS-Modelle der pulmonale Inflammation zeigen, dass Adenosin und die involvierten CD39 und CD73 Enzyme eine entscheidende Rolle spielen (16, 17).

Unsere Arbeitsgruppe konnte in dem von uns verwendeten murinen ARDS-Modell zeigen, dass die membrangebundenen Enzyme Ectoaprase (CD 39) und Ecto-5'-Nucleosidase (CD 73) eine entscheidende Rolle in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation spielen. In dieser Studie führte die Abwesenheit von membrangebundenem CD73 und CD39 zu erhöhter alveolärer PMN-Akkumulation und erhöhter mikrovaskulärer Permeabilität (14). Des Weiteren führte die Blockade von CD39 und CD73 bei Wildtyp-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der LPS-induzierten PMN-Migration im Alveolarraum gegenüber der Kontrollgruppe. Bei den CD39 und CD73 Knockout-Mäusen zeigten die Inhibitoren keine Effekte. Die Zufuhr von löslichem CD39 (Apyrase) und CD73 (Nucleotidase) reduzierte sowohl die LPS-induzierte PMN-Migration im Alveolarraum als auch die mikrovaskuläre Permeabilität. Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Theorie, dass Adenosin und Adenosinrezeptoren eine entscheidende anti-inflammatorische Rolle bei der pulmonalen Inflammation spielen.

Extrazelluläres Adenosin bindet an vier verschiedene G-Protein-gekoppelte Adenosinrezeptoren (A1AR, A2aAR, A2bAR und A3AR), welche ubiquitär sowohl auf hämatopoetischen als auch auf nicht hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Die physiologischen Funktionen der einzelnen Adenosinrezeptoren sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

	A1AR	A2aAR	A2bAR	A3AR
G-koppeltes Protein	Gi, Go	Gs, Golf	Gs, Gq	Gi, Gq
Intrazelluläre second messenger	cAMP ↓ IP3/ DAG ↑	cAMP ↑ IP3 ↑	cAMP ↑ IP3 ↑	cAMP ↓ IP3 /DAG ↑
Biologische Funktionen	Bradykardie Antinozi- zeption Lipolyse neg. Inotropie	Plättchen- aggregation ↓ Vasodilatation	Freisetzung von inflammatoris- chen Mediatoren	Mastzell- degranulation

**Tabelle 1: Physiologische Funktionen der Adenosinrezeptoren.**

Entnommen aus (18). DAG, Diacylglycerol; IP3, Inositol-Triphosphat; PetOH, Phosphatidylethanol.

Während die Adenosinrezeptoren A2a und A2b bereits als wichtige Rezeptoren im Rahmen der pulmonalen Inflammation etabliert sind, ist die Bedeutung von A1AR und A3AR bisher unzureichend beschrieben und ihre Rolle nicht systematisch evaluiert (19, 20).

Sowohl A1AR als auch A3AR werden in vielen Zellen exprimiert und spielen in inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle (13, 21). Beide Rezeptoren wurden in experimentellen Arbeiten, aufgrund teilweise widersprüchlicher Ergebnisse, kontrovers diskutiert (22).

Dabei führt sowohl A1AR als auch A3AR über das pertussistoxin-sensitive Gi-Protein zu einer Verminderung der Adenylatzyklaseaktivität und zur Senkung der cAMP-Konzentration. Ebenfalls führt die Aktivierung beider AR-Rezeptoren über das Gq-Protein zum Anstieg von Inositol-3-Phosphat (PI3) und

Diacylglycerol (DAG). Des Weiteren konnte für A1AR eine cAMP-unabhängige Aktivierung der Phospholipase C-Kaskade, welche durch G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheiten aktiviert wird, identifiziert werden (23, 24). Diese Aktivierung könnte einen alternativen cAMP-unabhängigen Schritt für die Regulierung inflammatorischer Prozesse darstellen.

Die Rolle des Adenosinrezeptors A3 haben wir systematisch mit unserem murinen ARDS-Modell untersucht. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass die Aktivierung des Adenosinrezeptors A3 in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation, anti-inflammatorische Effekte hat. Die Stimulation des Rezeptors führte zu einer verringerten PMN-Akkumulation in Interstitium und Alveolarraum und zu einem milderem Verlauf des akuten Lungenversagens. Des Weiteren reduzierte die Aktivierung des A3AR auch die LPS-induzierte Steigerung der alveolokapillären Permeabilität und somit das alveoläre Ödem. Die gewonnenen Daten zeigen, dass der Adenosinrezeptor A3 eine bisher unerkannt wichtige Rolle in der Pathophysiologie des LPS-induzierten ARDS spielt.

Der A1-Adenosinrezeptor wird ubiquitär in den Zellmembranen von hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen exprimiert (18). Auch in der Lunge wird A1AR in allen Zellkompartimenten exprimiert, in hohen Konzentrationen vor allem in Alveolarmakrophagen (25).

Die Rolle des Adenosinrezeptors A1 in inflammatorischen Prozessen wurde bis heute ebenfalls kontrovers diskutiert, aber nicht systematisch für das ARDS untersucht. Es konnten bisher sowohl pro-, als auch anti-inflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden. In einer früheren experimentellen Arbeit mit LPS-induzierter pulmonaler Inflammation bei Katzenlungen führte die pharmakologische Blockierung von A1AR zu einer geringeren Ödembildung und implizierte pro-inflammatorische Effekte (26). Neuere Arbeiten in einem murinen LPS-induzierten und Ischämie-Reperfusion Acute Lung Injury (ALI)-Modell konnten eher anti-inflammatorische Effekte nachweisen (27, 28). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung des Adenosin abbauenden Enzyms Adenosindeaminase (ADA) zu erhöhten Adenosinkonzentrationen in der Lunge führte. Weitere Ergebnisse dieser Studie

zeigten, dass sowohl gesteigerte Adenosinkonzentrationen als auch die gleichzeitige Ausschaltung des A1-Adenosinrezeptors zu einer gesteigerten pulmonalen Inflammation und Zerstörung der alveolären Architektur führte (25). Die Rolle des A1AR in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation wurde bisher nicht systematisch untersucht. In unserem ARDS-Modell zeigten A1AR-Knockout-Mäuse signifikant höhere PMN-Akkumulation im Interstitium und im Alveolarraum. Die pharmakologische Aktivierung des A1AR resultierte in einer deutlichen Reduktion der PMN-Migration sowohl im Interstitium als auch im Alveolarraum. In Versuchen mit chimären Mäusen konnten wir die besondere Bedeutung von hämatopoetischen Zellen für die anti-inflammatorischen Effekte demonstrieren.

Unsere Studiendaten zeigten auch, dass bei A1 Knockout-Mäusen die LPS-induzierte pulmonale Inflammation zu einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität führt. Die pharmakologische Aktivierung von A1AR führte zu einer signifikanten Reduktion des alveolären Ödems. In weiteren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die PMNs bei der Formation des alveolären Ödems eine entscheidende Rolle spielen. Die Depletion von PMNs resultierte in einer signifikant reduzierten Permeabilität, und die Effekte der pharmakologischen Aktivierung von A1AR bei PMN-depletierten Versuchstieren waren aufgehoben. Die pharmakologische Aktivierung des A1AR reduzierte auch die LPS-induzierte Freisetzung wichtiger inflammatorischer Chemokine, welche eine entscheidende Rolle in der pulmonalen Inflammation spielen.

In *in vitro*-Versuchen mit humanen PMNs konnten wir die Effekte der pharmakologischen Aktivierung ebenfalls beobachten. Auch hier führte die pharmakologische Aktivierung des A1AR zu einer signifikanten Verminderung der transendothelialen und transepithelialen Migration von PMNs.

Zusätzliche Versuche zeigten, dass A1AR eine protektive Rolle bei der LPS-induzierten zytoskelettalen Veränderung und Bildung von Sauerstoffradikalen spielt.

Zusammenfassend identifizieren unsere Daten extrazelluläres Adenosin als einen kritischen Mediator in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation. Ein gestörter Adenosinmetabolismus durch Fehlen der membrangebundenen



Enzyme CD39 und CD73 resultiert in einer gesteigerten pulmonalen Inflammation. Die Daten unserer Studie mit dem A3-Adenosinrezeptor implizieren seine besondere Relevanz in der Pathophysiologie des ARDS, insbesondere die wesentliche Beteiligung an der PMN-Migration in die Lunge. Dies wird durch die Reduktion der PMNs in der in vivo-Transmigration nach Vorbehandlung mit dem Agonisten untermauert. Weitere wesentliche Aspekte wie eine gesteigerte Permeabilität und Ausschüttung inflammatorischer Zytokine konnten unter der Vorbehandlung mit dem Agonisten signifikant reduziert werden. Schlussendlich identifizieren unsere Arbeiten den A1-Adenosinrezeptor als einen kritischen Mediator bei der Migration von PMNs im Rahmen der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation. Entscheidend für die protektiven Effekte scheint dabei vor allem der A1AR auf hämatopoetischen Zellen zu sein. Seine pharmakologische Aktivierung führte zu bisher unbekanntem anti-inflammatorischen Effekten sowohl in der PMN-Migration als auch in der mikrovaskulären Permeabilität. Diese Ergebnisse implizieren eine Schlüsselrolle des A1-Adenosinrezeptors in der Pathogenese der akuten pulmonalen Inflammation und könnten zukünftig eine therapeutische Option für die Behandlung des ARDS darstellen.

## 1.2 Wissenschaftliche Fragestellung

Experimentelle Arbeiten haben dem extrazellulären Adenosin und den vier Adenosinrezeptoren in inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle zugesprochen (12, 29). Die besondere Bedeutung des extrazellulären Adenosin konnte schon im Modell der Ventilator-induzierten ALI gezeigt werden (17).

Die Effekte von extrazellulärem Adenosin und von CD39 und CD73 Enzymen in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation wurden bisher nicht untersucht. In unserem ARDS-Modell nutzen wir die LPS-Inhalation um eine akute pulmonale Inflammation zu induzieren. Die Inflammation resultiert in den wesentlichen Merkmalen des ARDS, wie zum Beispiel die PMN-Infiltration der Lunge und gesteigerter Permeabilität (9). Unsere Arbeit zeigt, dass CD39 und CD73 eine entscheidende Rolle bei der LPS-induzierten Inflammation der Lunge spielt.

Der Fokus bisheriger Untersuchungen über die pulmonale Inflammation richtete sich vor allem auf die A2a und A2b Adenosinrezeptoren (19, 30). Die Untersuchungen über die A3- und A1-Adenosinrezeptoren zur pulmonalen Inflammation waren bisher unzureichend und teilweise widersprüchlich.

Das Ziel unserer Arbeit? war die systematische Untersuchung der Rolle von A1-Adenosinrezeptoren in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation. Wir untersuchten die LPS-induzierte PMN-Migration, mikrovaskuläre Permeabilität und Zytokinausschüttung. Des Weiteren interessierten uns die Effekte einer Aktivierung der A1-Adenosinrezeptoren, wie auch die Rolle dieser Adenosinrezeptoren bei chimären Mäusen. In Versuchen in vitro- haben wir die Effekte des A1-Adenosinrezeptors und dessen Aktivierung bei der LPS-induzierten PMN-Migration untersucht.

## 2 Material

### 2.1 Anästhesie

Produktname	Produktnummer	Hersteller
Atropinsulfat		
Isofluran	015-080-501	Abbott, Baar, CH
Ketamin	N63395.05	Ratiopharm, Ulm, D
NaCl 0,9%		Braun, Melsungen, D
Rompun 2%	KP058B0	Ratiopharm

### 2.2 RT-PCR

Produktname	Produktnummer	Hersteller
2-Propanol 99%	I9516	Sigma, Taufkirchen, D
Chloroform 99%	C2432	Sigma, Taufkirchen, D
DPBS without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	14190	Gibco, Gaithersburg, USA
Ethanol	A3678	AppliChem, Darmstadt, D
iQ <sup>TM</sup> SYBR <sup>®</sup> Green Supermix	170-8880	Bio-Rad Laboratories, München, D
iScript cDNA Synthese Kit	170-8891	Bio-Rad Laboratories, München, D
Murine A1AR KO Primer antisense: 5`- GAGAATACCTGGCTG GCTGACTAG-`3		Biomers, Ulm, D
Murine A1AR KO Primer sense: 5`-		Biomers, Ulm, D

GTACATCTCGGCCTTC CAGG-`3		
Murine A1AR Wildtyp Primer antisense: 5`- GAGAATACCTGGCTG ACTAG -`3		Biomers, Ulm, D
Murine A1AR Wildtyp Primer sense: 5`- GTACATCTCGGCCTTC CAGG-`3		Biomers, Ulm, D
Murine $\beta$ -Actin Primer antisense: 5`- GTTTGCTCCAACCAAC TGCT-`3		Biomers, Ulm, D
Murine $\beta$ -Actin Primer sense: 5`- ACATTGGCATGGCTTT GTTT-`3		Biomers, Ulm, D
Trizol Reagent	15596-018	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ultrapure, RNase- und DNase freies Wasser	10977	Gibco, Gaithersburg, MA, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	M-6250	Sigma, Taufkirchen, D

### 2.3 Western Blot

Produktname	Produktnummer	Hersteller
10x TGS Laufpuffer	161-0772	Bio-Rad Laboratories, München, D
APS (Ammoniumpersulfate) 10%	A-9164	Sigma, Taufkirchen, D
BCA™ Protein Assay Kit	23225	Pierce, Bonn, D
BSA (Bovine Serum Albumin)	A7906	Sigma, Taufkirchen, D
DMSO (Dimethylsulfoxide)	D5879	Sigma, Taufkirchen, D
DPBS with Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	14040	Gibco, Gaithersburg, USA
DPBS without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	14190	Gibco, Gaithersburg, USA
MagicMark™ XP Western Standard	LC5602	Invitrogen, Carlsbad, USA
RIPA (Radioimmunperipitation) -Assay Puffer : EDTA (Ethylenediamin- tetra acetic acid)	A3145	AppliChem, Darmstadt, D Merck, Darmstadt, D
NaCl	A4857	AppliChem, Darmstadt, D
Tris (Hydroxymethyl)- Base	CA-630	Sigma, Taufkirchen, D
2% Triton X100	234729	Sigma, Taufkirchen, D
NP-40 Igepal	17771	Sigma, Taufkirchen, D
SeaBlue® Plus 2	LC5925	Invitrogen, Carlsbad,

Standard		USA
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenedia mine)	T9281	Sigma, Taufkirchen, D
TWEEN 20	A4974	AppliChem, Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid 30%	1.08597	Merck, Darmstadt, D

## 2.4 In vivo Transmigration

Produktname	Produktnummer	Hersteller
2' Me-CCPA	2281	Tocris, Bristol, UK
DPBS without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	14190	Gibco, Gaithersburg, USA
Enzym-Lösung: 5ml DPBS without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	14190	Gibco, Gaithersburg, USA
5µl Collagenase XI	C7657	Sigma-Aldrich,
5µl Hyaluronidase	H3506	Taufkirchen, D (alle 3
5µl DNase	D4527	Enzyme)
Färbepuffer: DPBS without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	14190	Gibco, Gaithersburg, USA
5g BSA	A9418	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
2,5ml NaNO	443204	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Gr-1 633 Alexa (ungefärbt)		
Lipopolysaccharid	L6011	Sigma-Aldrich,

(Salmonella enteritidis)		Taufkirchen, D
NaCl 0,9%		
PFA 4% (Paraformalaldehyde)	P6148	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Türk'sche Lösung	109277	Merck, Darmstadt, D

## 2.5 Mikrovaskuläre Permeabilität

Produktname	Produktnummer	Hersteller
2' Me-CCPA	2281	Tocris, Bristol, UK
DPBS without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	14190	Gibco, Gaithersburg, USA
Ethanol	A3678	AppliChem, Darmstadt, D
Evans Blue	E2129	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Formamid liquid for molecular biology 99,5%	F7508	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Heparin-Natrium 5000IE/ml		Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Lipopolysaccharid (Salmonella enteritidis)	L6011	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
NaCl 0,9%		Ratiopharm GmbH, Ulm, D

## 2.6 BCA Proteinbestimmung

Produktname	Produktnummer	Hersteller
BCA™ Protein Assay Kit	23225	Pierce, Bonn, D
Lipopolysaccharid (Salmonella enteritidis)	L6011	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D



## 2.7 ELISA

Produktname	Produktnummer	Hersteller
2 <sup>Me</sup> -CCPA	2281	Tocris, Bristol, UK
Lipopolysaccharid (Salmonella enteritidis)	L6011	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Mouse CXCL-1/KC Duo Set <sup>®</sup>	DY453	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse CXCL-2/MiP-2 Duo Set <sup>®</sup>	DY452	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IL-6 Duo Set <sup>®</sup>	DY406	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse TNFa Duo Set <sup>®</sup>	DY 210	R&D Systems, Minneapolis, USA

## 2.8 Immunhistochemie

Produktname	Produktnummer	Hersteller
Avidin Blocking Kit	SP-2001	Vector Labs, Burlingame, USA
Bluing Reagent	7301	Richard-Allan Scientific, Kalamazo, USA
DAB Chromogen	S3000	DACO
DPBS without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	14190	Gibco, Gaithersburg, USA
Ethanol	A3678	AppliChem, Darmstadt, D
Eukitt <sup>®</sup> Quick	03989	Fluka, Buchs, CH
Formaldehyd 37%	F1268	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
FSGO Gelatin	G7765	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Hematoxylin I	7221	Richard-Allan Scientific,

		Kalamazo, USA
Lipopolysaccharid (Salmonella enteriditis)	L6011	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Methanol	1.06009.2511	Merck, Darmstadt, D
Natrium-Citrat	A0548.0550	AppliChem, Darmstadt, D
Pap Pen	H-4000	Vector Labs, Burlingame, USA
Schweinen Serum	26250-084	
Streptavidin-Peroxidase	S-911	Invitrogen, Carlsbad, USA
Vectastain ABC-Kit	PK-4004	Vector Labs, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30%	1.08597	Merck, Darmstadt, D
Xylol	28975.325	VWR Prolabor Chemikalien, Darmstadt, D

## 2.9 PMN-Isolation und Transmigrationsassay

Produktname	Produktnummer	Hersteller
2' Me-CCPA	2281	Tocris, Bristol, UK
ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Ethylenbenzothiazoline-6sulfonic acid)	A1888	Sigma, Taufkirchen, D
BSA (Bovine serum albumin)	A7906	Sigma, Taufkirchen, D
DPBS without Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	14190	Gibco, Gaithersburg, USA
HBSS (Hank`s buffered salt solution)	14175	Gibco, Gaithersburg, USA
Lyse Puffer: EDTA	A3145	AppliChem, Darmstadt, D
NaHCO <sub>3</sub>	S-8875	Sigma, Taufkirchen, D
NH <sub>4</sub> Cl	A0988	AppliChem, Darmstadt, D
Percoll 63%-Lösung: 63ml Percoll conc. 30ml DPBS without Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup> 7ml 10x DPBS without Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	17-0891	GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, S
Percoll 72%-Lösung: 72ml Percoll conc. 20ml DPBS without Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup> 8ml 10x DPBS without Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	17-0891	GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, S
Triton 10%	X100	Sigma, Taufkirchen, D

Wasserstoffperoxid 30%	1.08597	Merck, Darmstadt, D
Zitrat-Puffer: 200mM Natrium-Citrat	3580	Roth, Karlsruhe, D
200mM Citronensäure	8.18707	Merck, Darmstadt, D

## 2.10 Zytoskelettales Remodelling

Produktname	Produktnummer	Hersteller
2'Me-CCPA	2281	Tocris, Bristol, UK
Blocking Lösung (Normal Donkey Serum) 5%	sc-2044	SantaCruz
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	sc-3598	SantaCruz
Eindeckmedium: Glycerol	G-8773	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
DPBS		
DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane)	D-2522	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
HBSS (Hank`s buffered salt solution)	14175	Gibco, Gaithersburg, USA
Lipopolysaccharid (Salmonella enteriditis)	L6011	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
PFA (Paraformaldehyde) 3,7%		
Triton 10%	X100	Sigma, Taufkirchen, D

## 2.11 Antikörper

Produktname	Produktnummer	Hersteller
7/4 FITC (FACS)	MCA771F	AbD Serotec, Düsseldorf, D
A1AR-Agonist 2' Me-CCPA (diverse Versuche)	2281	Tocris Bioscience, Bristol, UK
A1AR-Antagonist DPCPX (in vivo Transmigration)	0439	Tocris Bioscience, Bristol, UK
A2b-Antagonist (in vivo Transmigration)	P0373	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Adenosine A1-R (H40) (Immunhistochemie)	Sc-28995	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, D
Adenosine Receptor A1 Polyclonal Antibody (Western Blot)	PA1-041A	Thermo Scientific, Bonn, D
Biotinylated rabbit anti-rat (Immunhistochemie)	BA-4001	Vector Labs, Burlingame, USA
CD45 PerCP (FACS)	557235	BD Pharmingen, San Diego, USA
FITC-Phalloidin (Immunfluoreszenz)	F432	Invitrogen,
Goat polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG	Ab6720	Abcam, Cambridge, UK
Gr-1 633 Alexa (FACS)	108412	BioLegend
Ig FITC (Donkey anti-goat) (Immunfluoreszenz)	sc-2024	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, D

IgG 2a FITC (FACS)	553929	BD Pharmingen, San Diego, USA
IgG2b APC (FACS)	553991	BD Pharmingen, San Diego, USA
Rat anti-mouse neutrophils (Immunhistochemie)	MCA771GA	AbD Serotec, Düsseldorf, D

## 2.12 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Produktname	Produktnummer	Hersteller
96 well 0,2 ml Thin-Wall PCR Plates	223-9441	Bio-Rad Laboratories, München, D
96 well Microplate	655001	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
Absaugpumpe VarioVaccubrand BVC 21	688260	Vacuubrand, Wertheim, D
Autoklav HICLAVE HV- 25	50006	HMC, Tüßing, D
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000 Elite	CEO 120	MDS Nordion, CDN
Brutschrank Cytoperm2	51011660	Haraeus, Hanau (D)
Centrifuge 5417 R	0021875	Eppendorf, Hamburg, D
Dispergierantrieb MICCRA D-9	163-4006938	ART Prozess- und Labortechnik, Müllheim, D
Dispergierwerkzeug DS- 8/P	163-6222320	ART Prozess- und Labortechnik, Müllheim, D
Durchflusszytometer FACSsort		Becton&Dickinson, Heidelberg (D)
Eismaschine AF-10	R 134-A	Scotsman, Sprockhoevel
GENios microplate Reader	F129004	Tecan Group Ltd, Männedorf, A
Gewebeinfiltrations- automat TP1050	04612711R001	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Heraus Megafuge 1.0R	75003060	Kendro Laboratory GmbH, Hanau, D
Histo Embedder EG	14038630527	Leica Microsystems,

11160		Wetzlar, D
iCycler	170-8740	Bio-Rad Laboratories, München, D
Inkubationswasserbad Typ 1003	1.4876	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel (D)
Küvetten	0030.106.300	Eppendorf, Hamburg, D
Labor-pH-Meter 526	BA11103	WTW Wissenschaftlich- Technische Werkstätten, Weilheim (D)
Luminometer	2-2118-CE	Bio Systems Inc, USA
Mastercycler Gradient	533100082	Eppendorf, Hamburg, D
Mehrkanalpipette	3114000158	Eppendorf, Hamburg, D
Mikroskop DM-IL	520802	Leica, Wetzlar, D
Mikrowelle Cookmate		DEAWOO, Butzbach (D)
Multiflex Tips	Y419.1	Carls Roth, Karlsruhe, D
Multipette Plus	4981000.019	Eppendorf, Hamburg, D
NucleoSpin Kit RNA II	740995.250	Macherey-Nagel, Düren, D
Photometer GENios		Tecan, Crailsheim, D
Photometer Ultraspec 3000 pro	80-2111-30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Pinzetten	BD312R, BD311R	Aesculap, Tuttlingen, D
PipetBoyacu	155000	INTEGRA Bioscience, Fernwald, D
Pipetten (0.1-2500 µl)	4910 000.018 4910 000.042 4910 000.093 4910 000.069 4910 000.077	Eppendorf, Hamburg, D
Plate washer Columbus		Tecan, Crailsheim, D



Plus		
Power Pack 3000	165-5056	Bio-Rad Laboratories, München, D
Quantimet 600		Leica, Wetzlar (D)
Rotationsmikrotom RM 235	RM 2235	Leica, Bensheim, D
Scheren	BC590R, BC060R	Aesculap, Tuttlingen, D
Sterile Workbench Lamin Air HB 2472	51011660	Kendro Laboratory GmbH, Hanau, D
Thermocycler Cyclone 25		PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
Thermomixer 5439		Eppendorf, Hamburg, D
Thermoschüttler AK 82		INFPORS AG, Bottmingen, CH
Türk'sche Lösung	109277	Merck, Darmstadt, D
Ultraschall Sonoplus GM 70		Bandelin electronic, Berlin, D
Venenverweilkanülen 22GA	REF 381223	Becton Dickinson, Madrid, E
Vernebler MICRO-A-I-R U22	070501015	OMRON Healthcare, USA
Vortex Genie	G-560E	Scientific Industries Inc, Bohemia, USA
Vortex K-55-GE		Bender und Hobein AG, Zürich, CH
Waage HR-120-EC	3120718	A&D Instruments, Ltd., Ahrensburg, D
Waage Scout II		Ohaus, Kirchheim, D
Wärmeplatte HI1220	042321474	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Wasserbad HI1210	041521466	Leica Microsystems,

		Wetzlar, D
Zentrifuge 5417R	5407000.317	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	75003490	Haraeus, Hanau (D)
μ-Slide I	80606	Ibidi, Martinsried- München, D

## 2.13 Software

Produkt	Hersteller
AxionVision Digital Image Processing Software	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, D
BD CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Flow Jo 6.5	Tree Star Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
Leica Software	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Magellan™ Data Analysis Software	Tecan, Männerdorf, CH
Word/Excel/Power Point	Microsoft Office 2010,

### **3 Methoden**

Die Versuche erfolgten mit Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen. Die Tierversuchsgenehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen (Genehmigungsnummer A1/06) liegt vor.

#### **3.1 Anästhesie**

Um eine ausreichende tiefe Narkose für die Versuchsuntersuchungen zu erreichen, wurde eine Anästhesie-Mischung mit Ketamin (125mg/kg), Atropin-Sulfat (0,025mg/kg), Rompun 2% (12,5mg/kg) in 710µl NaCl 0,9% hergestellt. Die Anästhesie-Mischung wurde intraperitoneal injiziert und führte in wenigen Minuten zum Verlust von spinalen und kornealen Reflexen. Die Dauer der Untersuchungen betrug maximal 30 Minuten und nach Ende der Untersuchungen wurden die Tiere in tiefer Narkose ausgeblutet. Repetitive Gaben der Anästhesie-Mischung waren sehr selten nötig.

Für die kurzzeitige Entnahme von PCR-Proben oder Blutentnahmen wurde Isofluran verwendet. Die Inhalation von Isofluran fand zur Vermeidung von Umweltkontamination, in einer speziellen Kammer unter einem Laborabzug statt.

#### **3.2 Mausstämme und Zelllinien**

Für die in vivo-Versuche wurden C57Bl/6 Mäuse von Charles River (Sulzbach, Deutschland) verwendet. Die A1AR Knockout-Mäuse mit C57Bl/6-Hintergrund wurden freundlicherweise von Jürgen B. Schnermann (National Institutes of Health, Baltimore, MD, USA) zur Verfügung gestellt. Es wurden ausschließlich männliche Tiere im Alter zwischen acht und zwölf Wochen verwendet.

Bei in vitro-Transmigrationsversuchen wurden humane Epithelzellen der Lunge A549 von ATL (CCL-185, LGC Standards, Wesel) und humane Endothelzellen HMVEC-L (CC-0264, Lonza, Köln) verwendet. Humane neutrophile Granulozyten wurden von gesunden Blutspendern gewonnen.

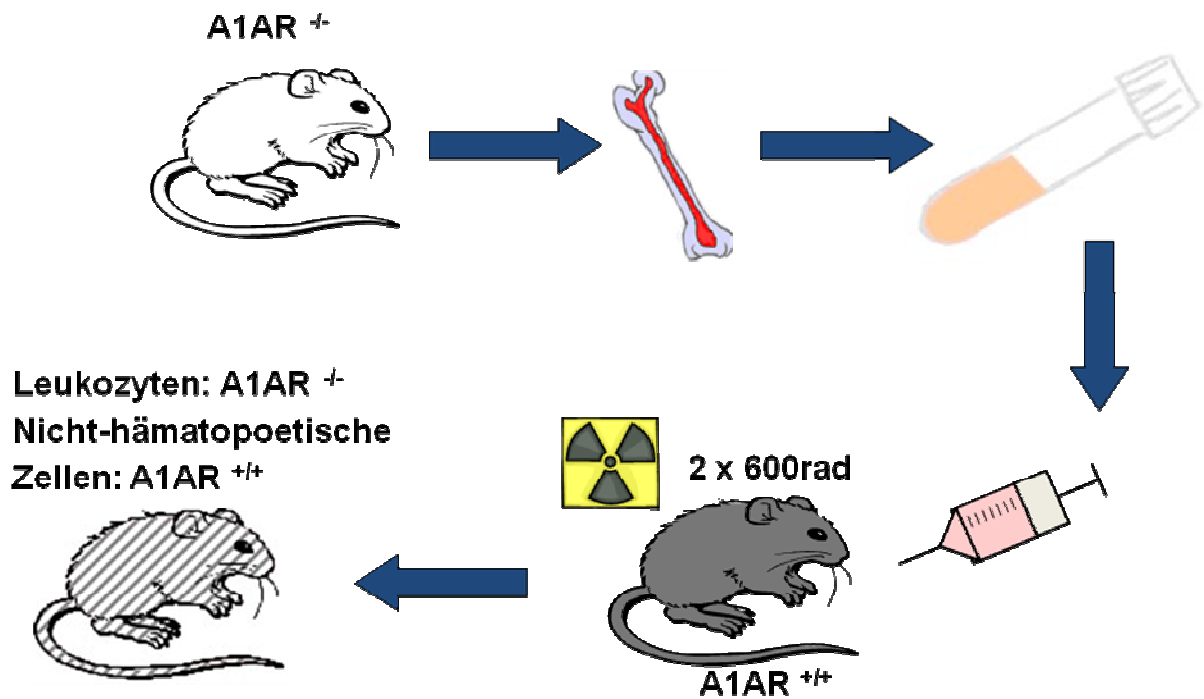
### **3.3 Herstellung von chimären Mäusen**

Adenosin Rezeptor A1 wird sowohl in Epithel- und Endothelzellen der Lunge als auch in neutrophilen Granulozyten exprimiert. Zur Evaluation, bei welchen Zellen der A1AR die entscheidende Rolle in der pulmonalen Inflammation spielt, wurden chimäre Mäuse hergestellt. Die Generierung von chimären Mäusen fand nach Bestrahlung mittels Knochenmark (KM) Transplantation zwischen Wildtyp und A1AR<sup>-/-</sup>-Mäuse statt.

#### **3.3.1 Durchführung**

Das Knochenmark wurde aus Femur und Tibia von Wildtyp und A1AR<sup>-/-</sup> Mäusen gewonnen. In tiefer Narkose wurden die Vena cava inferior durchtrennt und die Tiere durch Ausbluten getötet. Die Beine wurden entnommen und Haut und Muskulatur entfernt. Femur und Tibia wurden freigelegt und die Knochenenden abgetrennt. Mit 5ml PBS wurde der Knochen gespült und das Knochenmark in einer sterilen Petrischale aufgefangen. Das Knochenmark von mehreren Mäusen wurde in einem 50ml Falconröhrchen gepoolt und dann zentrifugiert (1300RPM, 10 Minuten, 4°C). Der Zellpool wurde lysiert und erneut zentrifugiert (1300RPM, 10 Minuten, 4°C). Es folgte die Bestimmung der Zellzahl und die Aliquotierung des Zellpools zur Endkonzentration von 10 Millionen pro ml.

Wildtyp- und A1AR<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden im Abstand von 4 Stunden zwei Mal mit je 600 rad bestrahlt. Unmittelbar nach der zweiten Bestrahlung erfolgte die Knochenmarkstransplantation von 5 Millionen Zellen durch intravenöse Gabe in die Schwanzvene. Die Tiere wurden für 6-8 Wochen zur Rekonstitution des Knochenmarks unter sterilen Bedingungen gehalten. Zur Versorgung der Tiere bis zu den Untersuchungen wurde Nahrung und sterilisiertes Wasser verwendet. Die antibiotische Behandlung erfolgte mit Cotrim.



**Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Knochenmarks-Transplantation zur Herstellung von chimären Mäusen (mit freundlicher Genehmigung Prof. Reutershan).**

Nach vollständiger Rekonvaleszenz wurden die chimären Mäuse für in vivo-Transmigrationsversuche verwendet.

Als Kontrolle der Rekonstitution des Knochenmarks und Bestätigung für den Erfolg der Bestrahlung bekam pro Gruppe eine Maus keine Knochenmarktransplantation. Die Kontrollmäuse verstarben innerhalb von 2 Wochen nach Bestrahlung.

### **3.4 RT-PCR**

#### **3.4.1 Einleitung**

Zur Bestimmung der Transkription des Adenosinrezeptors A1 wurde die mRNA von Mauslungen gewonnen und mittels des etablierten Verfahrens der RT-PCR bestimmt. Die gewonnene mRNA wurde, mittels reverser Transkriptase, in komplementäre DNA für die Durchführung der RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) überschrieben.

#### **3.4.2 Durchführung**

In tiefer Narkose erfolgte die Eröffnung des Thorax der Versuchstiere und die subdiaphragmale Durchtrennung der Vena cava inferior. Um die Lunge vom zirkulierenden Blut zu befreien, wurde der rechte Herzventrikel punktiert und bei schlagendem Herzen 10ml PBS- langsam injiziert. Die Lungen wurden entnommen, in Kryotubes gelagert und zur sofortigen Schockgefrierung in flüssigen Stickstoff gegeben. Von den gefrorenen Lungen wurde 100µg mit 350µl Lysepuffer versetzt und homogenisiert. Es folgte der Transfer in Filtertubes zur RNA-Extraktion. Das homogenisierte Zelllysat wurde für 1 Minute bei 11000RPM zentrifugiert und der Filter entfernt. Im restlichen Zelllysat wurden 350µl 70% Ethanol hinzugefügt, gemischt und dann den blauen Filter pipettiert mit anschließender Zentrifugation bei 8000RPM für 30 Sekunden. Die RNA und DNA setzten sich in der Silikatmembran ab. 350µl Membran Desalting Buffer wurden hinzugegeben und erneut bei 11000RPM für 1 Minute zentrifugiert. Nach der Trocknung folgte die Verdauung der Rest-DNA mittels 95µl DNAase-Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgten mehrere Waschvorgänge zur Entfernung von Verunreinigungen. Anschließend wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen, das RNA-Pellet nach Trocknung mit 40µl RNAase freiem Wasser eluiert.

Es folgte die photometrische Bestimmung von 1µl RNA in 99µl Nuklease freiem Wasser bei 260nm und 280nm. Zur Synthetisierung der cDNA wurden 5µl der Proben mit 4µl 5x iScript Reaction Mix und 1µl iScript Reverse Transkriptase gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hier wurde fakultativ eine erneute Messung der cDNA bei 260nm und 280nm durchgeführt.

Zielkonzentration der untersuchten cDNA waren 100µg in 1000µl und die Verdünnung erfolgte mit Nuklease-freiem Wasser. In jedem Well einer 96 Well-Platte wurden 1µl der cDNA Probe und 21µl des Primer-Mix (Seite X) hinzugefügt. Die Well-Platte wurde mit Klebefolie verschlossen bei 2000 RPM für 30 Sekunden zentrifugiert, damit sich die Proben für die Messungen am Boden befinden. Für die Messung wurde der iCycler iQ Real-Time Detection System und die entsprechende Software von Bio-Rad verwendet. Die entsprechenden sense und antisense Primer waren: 5'-GTACATCTCGGCCTTCCAGG-3' und 5'-GAGAATACCTGGCTGACTAG-3'. Als Kontrollen diente das murine β-Actin mit folgendem sense und antisense Primer: 5'-ACATTGGCATGGCTTTGTTT-3' und 5'-GTTTGCTCCAACCAACTGCT-3'.

## **3.5 Western Blot**

### **3.5.1 Einleitung**

Ziel von Western Blot oder Immuno Blot ist die Detektierung eines spezifischen Proteins, mittels Antigen-Antikörper Bindung. Dabei bindet ein Antikörper an eine spezifische Bindungsstelle des gesuchten Proteins. An der Fc-Stelle des primären Antikörpers folgt die Bindung des sekundären Antikörpers, welcher mittels Peroxidase eine enzymatische Reaktion verursacht.

### **3.5.2 Durchführung**

Wie schon oben vorbeschrieben wurden die Mäuse anästhesiert, die Lungen frei präpariert und 50mg Proben entnommen. Pro Probe wurde 1ml Protease-Inhibitor/RIPA-Lösung hinzugegeben, die Proben wurden für 15 Minuten inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Untersuchungen konnten gleich oder zu einem späteren Zeitpunkt fortgesetzt werden. Im halbgefrorenen Zustand erfolgte die Homogenisierung des Gewebes mit anschließender Zentrifugation bei 13000RPM. Der Überstand wurde in sterile Eppendorf-Röhrchen pipettiert und das Proteinisolat bei -80°C gelagert. Es folgte die Proteinbestimmung mittels BCA Proteinkonzentration nach Pierce. Dabei wurde als Standard Rinder-Serumalbumin in 6 Konzentrationen von 0,0625 bis 2mg/ml verwendet. Das Proteinisolat wurde in 3 verschiedene Konzentrationen (1:10, 1:20 und 1:50) mit Aqua dest. verdünnt. In 96 Well-Platten wurden jeweils 25µl Standard oder Probe und 200µl Substratmischung pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte die photometrische Proteinbestimmung mittels Tecan Reader bei 562nm.

Aus den Proteinproben werden 20µg Probe in RIPA- und Laemmli(4x)-Puffer aliquotiert. Die Separation der Proteine erfolgte mittels Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Es folgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben Richtung Anode für 90 Minuten bei 110 Volt in Tris Puffer. Zur Visualisierung der Auftrennung wurde Seablue Marker verwendet. Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel vorsichtig entnommen und auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran gelegt. Der Transfer erfolgte erneut bei 110V für 90 Minuten. Dabei haftete die



Proteinprobe aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auf der Membran und die Proben wurden für die Antikörpermarkierung zugänglich. Die Membran wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur in Blocking-Lösung (5% Magermilch, 5% BSA und 0,1% Tween 20) gelegt. Dadurch sollten unspezifische Bindungen auf der Membran verhindert werden. Es folgte die Markierung mit einem polyklonalen (aus Kaninchen) Anti-A1AR-Antikörper (Affinity BioReagents) über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Proben drei Mal mit 0,1% TBST jeweils 10 Minuten gewaschen. Dann wurde die Membran mit den sekundären HRP-markierten Antikörper für 45 Minuten inkubiert. Danach erneut die Proben drei Mal mit 0,1% TBST jeweils 10 Minuten gewaschen um unspezifische Bindungen zu entfernen. Es folgte die Visualisierung der Proteinproben mittels Diana CCD Kamera. Die Kontrolle erfolgte über Bestimmung von  $\beta$ -Aktin. Dabei wurde ein polyklonaler (aus Kaninchen) Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper und der gleiche sekundäre Antikörper verwendet.

Die Western Blot Bestimmung von A1AR wurde nach dem gleichen Prinzip bei Versuchen im murinen Modell bei WT- und A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach LPS-Exposition und nach Depletion durchgeführt. Des Weiteren auch bei humane PMNs, Endothel- und Epithelzellen unter verschiedenen Konditionen durchgeführt.

### **3.6 Differentialblutbild**

#### **3.6.1 Einleitung**

Zur Bestimmung des Differentialblutbildes und möglicher Unterschiede in den Leukozytenpopulationen wurde Blut aus der Schwanzvene von Wildtyp- und A1AR Knockout-Mäusen entnommen. Von jeder Maus wurde ein mittelgroßer Blutstropfen auf einen Objektträger aufgetragen und ein Ausstrich angefertigt. Der Ausstrich wurde bei Raumtemperatur zur Trocknung aufbewahrt.

Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll der Schnellfärbemethode Diff Quik®. Diese besteht aus zwei gebrauchsfertigen Färbelösungen (Xanthen- und Thiazin-Färbelösung) und einer Fixierlösung.

### **3.6.2 Durchführung**

Die einzelnen Schritte der Färbung wurden wie folgt durchgeführt. Der Objektträger mit dem Blutaussstrich wurde jeweils fünf Mal für eine Sekunde zuerst in die Fixierungslösung, dann in die Xanthen-Farblösung und zum Schluss in die Thiazin-Farblösung eingetaucht. Zwischen den einzelnen Schritten wurde der Objektträger abgetropft. Nach den Färbeschritten wurden die Objektträger in destilliertes Wasser eingetaucht und bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Präparate unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

Die Differenzierung der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen erfolgte über die unterschiedlichen Zellgrößen und Färbungen von Kernen und Zytoplasma beziehungsweise der Zellgranula (siehe Tabelle 2).

<b>Leukozyten</b>	<b>Kern</b>	<b>Zytoplasma/Granula</b>
neutrophile Granulozyten	dunkelblau	pink
basophile Granulozyten	dunkelblau	violett bis schwarz
eosinophile Granulozyten	dunkelblau	rot
Makrophage/ Monozyten	violett	hellblau
Lymphozyten	violett	hellblau

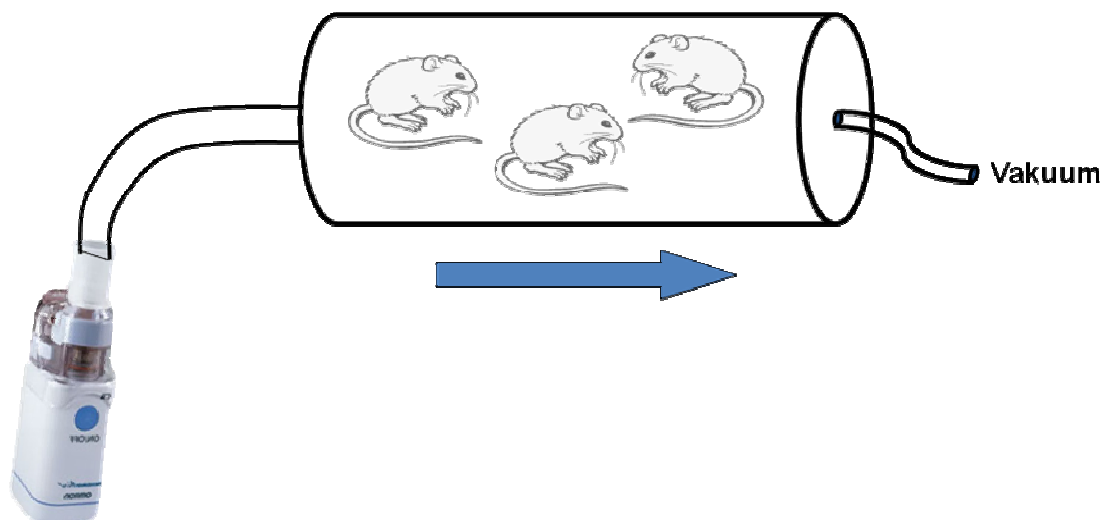
***Tabelle 2: Färbungsmerkmale von Kernen, Zellorganellen und Granula von Leukozyten im Differentialblutbild.***

### **3.7 Depletion von neutrophilen Granulozyten**

Um zu untersuchen, ob der Adenosin Rezeptor A1 auf den hämatopoetischen oder nicht hämatopoetischen Zellen für die anti-inflammatorischen Effekte im Rahmen der pulmonalen Inflammation verantwortlich ist, wurde bei einem Teil der Versuchstiere eine Depletion von PMNs durchgeführt. Die Depletion von zirkulierenden PMNs wurde durch die intravenöse Injektion von 100µg Anti-Granulozyten-Antikörper 24 Stunden vor den Untersuchungen erreicht. Die Depletion reduzierte die Anzahl der Granulozyten weit über 95% im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 3.8 ARDS-Modell

Die Inhalation von Lipopolysaccharid (LPS, *Salmonella enteritidis*, 500µg/ml) wurde mit Hilfe eines speziellen Verneblers (MicroAir, Omron Healthcare, Vernon Hills, IL, USA) durchgeführt. Das LPS-Aerosol wurde in einer speziellen Plexigaskammer von einer Seite eingeleitet und der kontinuierliche Fluss wurde mittels Vakuum auf der anderen Seite gewährleistet. Pro Versuch wurden 4 Mäuse in der Kammer dem LPS-Aerosol ausgesetzt. Zu Vermeidung von Umweltkontaminationen fand die Inhalation unter Laborabzug statt. Nach Beendigung der LPS-Inhalation wurden die Tiere unter Laborabzug bis zum Versuch aufbewahrt.



**Abbildung 3: Aufbau der LPS-Verneblung (mit freundlicher Genehmigung Prof. Reutershan).**

Die LPS-Inhalation induzierte eine transiente pulmonale Inflammation, wie schon von unserer Arbeitsgruppe vorherbeschrieben, welche in einer kaskadenartigen Rekrutierung und Migration neutrophiler Granulozyten in allen Lungenkompartimenten (intravaskulär, IV, Interstitium, IS und Alveolarraum, BAL) resultierte. Zur mikroskopischen Darstellung der Migration neutrophiler Granulozyten und der inflammationsbedingten Destruktion der Lunge wurden immunhistochemische Bilder angefertigt. Die Veränderung der mikrovaskulären Permeabilität wurde mittels Evans Blue Extravasation und BAC (bicinchoninic-acid)-Proteinbestimmung bestimmt. Inflammatorische Chemokine spielen in der

pulmonalen Inflammation eine entscheidende Rolle, deswegen wurden in der BAL CXCL1, CXCL2/3, IL-6 und TNF  $\alpha$  bestimmt.

### **3.9 Migration neutrophiler Granulozyten in den Lungekompartimenten**

#### **3.9.1 Einleitung**

Die LPS-bedingte pulmonale Inflammation induzierte einen signifikanten Anstieg von Leukozyten, vor allem von neutrophilen Granulozyten, in allen Kompartimenten der Lunge. Frühere Arbeiten zur pulmonalen Inflammation haben die Anzahl der Leukozyten nur in der Bronchoalveolären Lavage bestimmt. Die Anzahl der adhärenen Leukozyten und der Leukozyten im Interstitium wurde dabei nicht berücksichtigt. In unserem Modell verwenden wir eine durchflusszytometrische Methode, welche durch Vorarbeiten des Arbeitsgruppenleiters eingeführt und etabliert wurde. Durch spezifische fluoreszierende Antikörper gegen neutrophilen Granulozyten kann eine Differenzierung zwischen den adhärenen Granulozyten im Intravaskularraum und den bereits migrierten Granulozyten im Interstitium gemacht werden. Die PMNs im Alveolarraum wurden in der BAL gewonnen und quantifiziert.

Im Einzelnen, kurz vor Versuchsbeginn, wurde ein spezifischer fluoreszierender Antikörper (Gr-1 633 Alexa) gegen PMNs intravenös injiziert zur Markierung von intravaskulären PMNs. Die Lunge wurde dann entnommen, homogenisiert und mit einem zweiten spezifischen Antikörper (7/4 Klon) zur Markierung der interstitiellen Granulozyten versetzt. Mittels dieser Technik konnte zwischen den intravaskulär adhärenen Granulozyten und den migrierten Granulozyten im Interstitium differenziert werden.

#### **3.9.2 Durchführung**

Die Untersuchungen begannen 24 Stunden nach LPS-Exposition mit der intravenösen Injektion von fluoreszierendem Gr-1 633 Antikörper. Es folgte die intraperitoneale Gabe von 300 $\mu$ l Anästhesie-Lösung. Nach 5 Minuten kam es bei den Versuchstieren zur Auslösung von spinalen Reflexen und zu einer ausreichenden Narkosetiefe. Die Tiere werden auf dem Rücken an einen OP-Tisch fixiert und die Haut vom Unterkiefer bis zum unteren Abdomenbereich

entfernt. Der Thorax wurde, mittels einer medianen Thorakotomie eröffnet und die Vena cava inferior subphrenisch durchgetrennt. Der rechte Herzventrikel wurde punktiert und 10ml PBS- bei schlagendem Herzen langsam injiziert. So wurde das restliche Blut aus dem pulmonalen Gefäßstromgebiet und somit alle nicht-adhären PMNs entfernt. Zur Gewinnung der bronchoalveolären Lavage wurde die Trachea freipräpariert und mit einer 24G Venenverweilkanüle punktiert und fixiert, um Dislokationen zu vermeiden.

Mit einer Spritze wurde 1ml kaltes PBS- injiziert, vorsichtig aspiriert und in einem 10ml Falcon-Röhrchen auf Eis aufbewahrt. Dieser Vorgang wurde 5mal wiederholt bis 5ml BAL Flüssigkeit gewonnen wurde. Die BAL-Flüssigkeit wurde zentrifugiert (1300RPM, 10 Minuten, 4°C), die Flüssigkeit verworfen und das Zellpellet mit 1ml Färbepuffer resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10µl BAL in 90µl Türk'scher Lösung resuspendiert und davon 10µl in eine Neubauer Zellkammer pipettiert. Es folgte die Berechnung der Zellzahl auf 1ml BAL Flüssigkeit mittels folgender Formel: Zellzahl in 1000µl = Zellzahl x 2,5 (Faktor der Zählkammer) x 10 (Faktor der Verdünnung) x 1000 (Faktor auf 1ml berechnet) x 1 (Milliliter der Zellsuspension).

Dann wurde die Lunge vom Thorax entfernt, die einzelnen Lappen vom restlichen Gewebe freipräpariert, in einer Petrischale klein geschnitten und 5ml Enzym-Lösung mit ungefärbten Gr-1 Antikörper hinzugegeben. Dadurch wurden die noch freien Gr-1-Rezeptoren im Interstitium befindlichen PMNs geblockt. Die Lunge wurde im Dunkeln für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt. Es folgte das Durchsieben des Lungengewebes durch einen 70µm Filter zur Trennung der Leukozyten vom restlichen Lungengewebe und Spülung mit 15-20ml kaltem PBS-. Im Filter übriggebliebenes Lungengewebe wurde verworfen und die Zellsuspension zentrifugiert (1300RPM, 10 Minuten, 4°C). Das Zellpellet wurde mit 5ml Lyse-Lösung zur Lysierung von Erythrozyten resuspendiert und für 5 Minuten bei -4°C im Dunkeln aufbewahrt. Der Lysevorgang wurde mit 20ml PBS- unterbrochen und erneut zentrifugiert (1300RPM, 10 Minuten, 4°C). Das Zellpellet wurde in 3ml Färbepuffer resuspendiert und die gesamte Zellzahl mit der oben angegebene Formel

berechnet. Dabei wurde berücksichtigt, dass das Zellpellet der Lungen in 3ml resuspendiert wurde.

Für die Durchflusszytometrie wurden jeweils 200.000 Zellen in 100ml benötigt und entsprechend nach der Zellbestimmung die Zellsuspensionen von BAL Flüssigkeit und Lunge verdünnt oder konzentriert.

In jedes FACS-Röhrchen wurden 200.000 Zellen/100ml gegeben und dann nach folgendem Färbungsschema die fluoreszierenden Antikörper pipettiert.

BAL	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
1.ungefärbt	x			
2.7/4 FITC	x			
3.CD45 PerCP	x			
4.Gr-1 633	x			
5.CD45PerCP IgG2a FITC IgG2b APC	x			
6.7/4 FITC CD45 PerCP Gr-1 633	x	x	x	x

Lunge	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
6.7/4 FITC CD45 PerCP	x	x	x	x

***Tabelle 3: Markierungsprotokoll mit fluoreszierenden Antikörpern für Proben aus BAL-Flüssigkeit und Lunge.***

Zur Bindung der fluoreszierenden Antikörper wurden die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Danach wurden 2ml Färbepuffer hinzugefügt, resuspendiert und zentrifugiert (1300RPM, 10 Minuten, 4°C).

Dann wurde der Überstand entfernt und es wurden erneut 2ml Färbepuffer hinzugefügt, resuspendiert und erneut zentrifugiert (1300RPM, 10 Minuten, 4°C). Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt und nach der zweiten Zentrifugation wurde das Zellpellet mit 400µl Fixier-Lösung resuspendiert. Die

Messung fand am FACS-Sort von Becton Dickinson und die Einstellung der DotPlots mit Hilfe der CellQuestPro-Software statt. Die endgültige Analyse und Darstellung wurde mit Hilfe der FlowJo-Software durchgeführt.

### **3.10 Durchflusszytometrie**

#### **3.10.1 Einleitung**

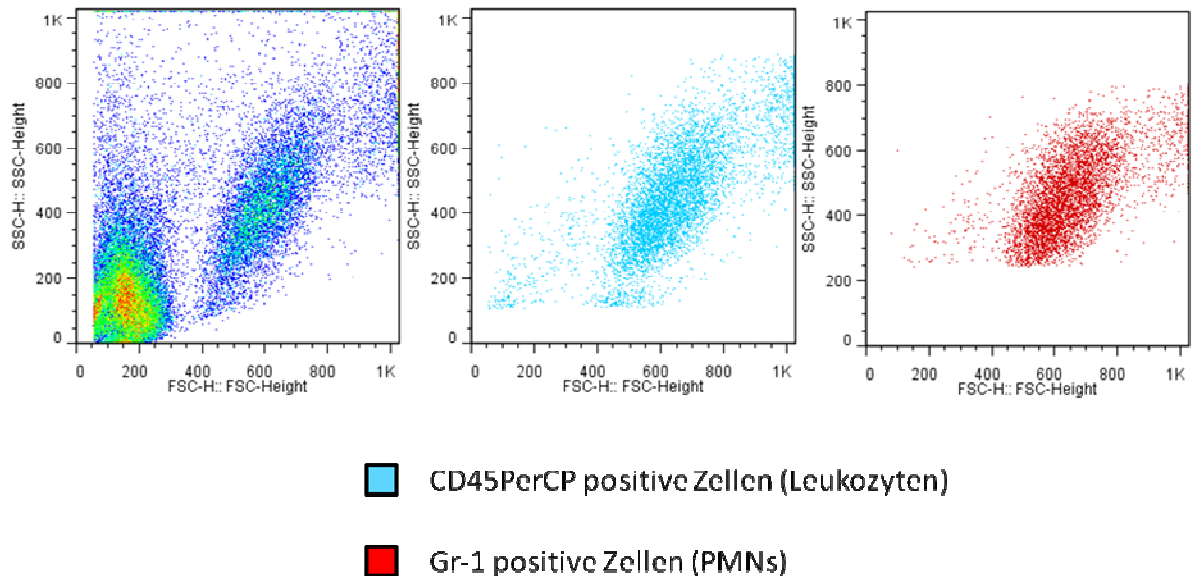
Das Messprinzip der Durchflusszytometrie ist die phänotypische Charakterisierung von Zellen mittels eines optischen Messsystems. Mit Hilfe dieses Verfahrens können Zellgröße, Zellgranularität, Faltung und Fluoreszenz von zuvor mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Zellen bestimmt werden. Zuvor teilweise markierte Einzelzellen werden in einem laminaren Strom in das Zytometer gesaugt und jede einzelne Zelle wird einem fokussierten Lichtstrahl (Laserstrahl) ausgesetzt. Das Licht wird beim Auftreffen auf der Zelle gestreut und diese Streuung wird mittels spezifischer Detektoren gemessen. Je nach Größe, Granularität, Form und Membranfaltung wird das Licht unterschiedlich gestreut. Durch die Brechung des Lichts an der Zelloberfläche wird die Größe der Zelle gemessen und am Forwardscatter (FSC) dargestellt. Durch die Brechung des Lichts durch die Zellgranula und Zellorganellen wird die Granularität gemessen und am Sidewardscatter dargestellt. Gebundene fluoreszierende Antikörper an der Zelloberfläche werden durch den Laserstrahl angeregt und die entstandenen Emissionen werden durch spezielle Detektoren empfangen. Des Weiteren stellt die Intensität der Lichtemission ein quantitatives Maß für die gebundenen Antikörper dar. Zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen der fluoreszierenden Antikörper wurden zusätzlich bei jedem Versuch Isotypkontrollen durchgeführt. Diese wurden dann im Durchflusszytometer eingesetzt um die Fluoreszenz der unspezifischen Bindungen zu unterdrücken.

Da sich das Emissionsspektrum vieler Fluoreszenzfarbstoffe partiell überlappt, kann es bei Mehrfachanalysen zur Beeinträchtigung der Ergebnisse kommen. Um Überschneidungen der Emissionen zu vermeiden, muss mit Hilfe von Kontrollproben eine Kompensation durchgeführt werden. Mit der Kompensation findet eine mathematisch-rechnerische Korrektur statt, wobei die Emissionen für



den Fluoreszenzfarbstoff fremden Detektor subtrahiert werden. Zur genauen Kompensation wurden in Proben die verwendeten Farbstoffe getrennt voneinander gemessen (siehe Tabelle 3).

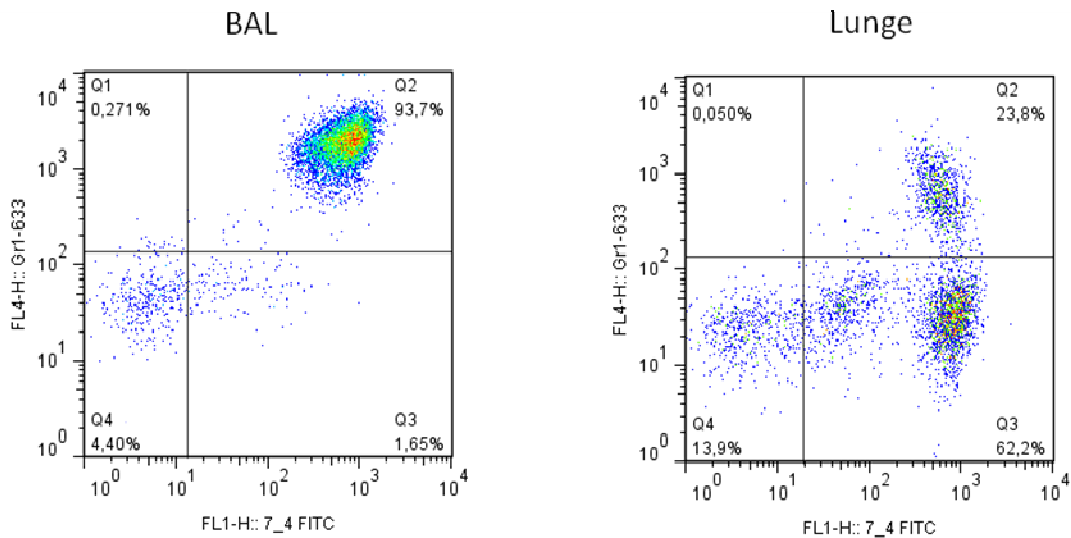
### BAL nach LPS-Exposition



#### **Abbildung 4: Durchflusszytometrische Bestimmung der LPS-bedingten PMN-Migration im Alveolarraum.**

*Nach Bestimmung der Gesamtanzahl der Leukozyten in der BAL wurde mit Hilfe spezifischer fluoreszierender Antikörper der relative Anteil der PMNs bestimmt.*

Die Quantifizierung des prozentualen PMN-Anteils (Gr-1 633 positiv) erfolgte durch spezifische Färbungen und die Auswertung mittels des FlowJo Programms (Version 6.5). Die Berechnung des absoluten PMN-Anteils an der gesamten Leukozytenpopulation erfolgte anschließend mittels des Excel-Programms (Microsoft Office, Version 1997-2003).



Q1 Gr-1 633 positiv, 7/4 FITC negativ  
 Q2 Gr-1 633 positiv, 7/4 FITC positiv  
 Q3 Gr-1 633 negativ, 7/4 FITC positiv  
 Q4 Gr-1 633 negativ, 7/4 FITC positiv

**Abbildung 5: Quantifizierung von PMNs in der BAL und Lunge.**

Bestimmung des prozentualen Anteils der PMNs der gesamten Leukozytenpopulation, mittels spezifischer Antikörperfärbung (Gr-1 633 und 7/4 FITC).

**3.10.2 Durchführung**

In der BAL wurden die PMNs sowohl mit 7/4 FITC als auch mit Gr-1 633 markiert (Tabelle 3). Nach Entnahme der Lungen und Gewinnung der Leukozyten erfolgte die Markierung nach dem oben dargestellten Färbungsplan (Tabelle 2). Die adhärennten PMNs im Intravaskularraum wurden durch die iv.-Gabe des Gr-1 633 vor der Organentnahme doppelt markiert. Durch dieses Färbungsschema konnten wir den Anteil der PMNs im Interstitium und bronchoalveolären Raum differenzieren. Aus der Gesamtpopulation der Leukozyten konnte dann die absolute Anzahl der PMNs berechnet werden.

**3.11 Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität**

**3.11.1 Einleitung**

Neben der Infiltration neutrophiler Granulozyten ist die Störung der mikrovaskulären Permeabilität, welche das Lungenödem zur Folge hat, ein weiteres Merkmal der akuten respiratorischen Insuffizienz.

Evans Blue bindet an Serumalbumin, welches bei gestörter Gefäßpermeabilität, ins entzündliche Lungengewebe austritt. Mittels photometrischer Messung der Evans Blue Extravasation kann mit Hilfe einer Standardkurve die Konzentration von Evans Blue gemessen werden und indirekt auf das Ausmaß der Gefäßpermeabilität geschlossen werden.

### **3.11.2 Durchführung**

Die intravenöse Applikation von Evans Blue erfolgte gewichtsadaptiert (20mg/kg KG) 5 1/2 Stunden nach der LPS-Inhalation. Für die Versuche wurde 30 Minuten nach der Evans Blue Injektion intraperitoneal 300µl Anästhesie-Lösung injiziert. In tiefer Narkose wurde die Haut vom Unterkiefer bis zum unteren Abdomen entfernt, der Thorax eröffnet und mit heparinbenetzter Spritze der rechte Herzventrikel punktiert und venös Blut aspiriert. Bis zu 500µl wurden für die Evans Blue Messung im Plasma entnommen. Es folgte subphrenisch die Durchtrennung der Vena cava inferior, die Punktion des rechten Herzventrikels und Spülung mit 10ml PBS-. Sobald die Lunge blutfrei war, wurden die Lungen vom Thorax entnommen und die einzelnen Lappen freipräpariert. Die Lunge wurde dann gewogen und gewichtsadaptiert ( $3,5 \times \text{Gewicht der Lunge in } \mu\text{g} = \text{Anzahl der } \mu\text{l PBS-}$ ) PBS- hinzugefügt. Das entnommene Blut wurde bei 15.000 RPM für 30 Minuten zentrifugiert zur Auftrennung des Plasmas vom korpuskulären Blutanteil. Die Lungen wurden in PBS- homogenisiert und vom Homogenisat wurden 500µl in 1000µl Formamid pipettiert. Das Formamid wurde für die Trennung des Evans Blue vom Protein benötigt. Das Formamid-Homogenisat wurde dann bei 60°C für 12-18 Stunden inkubiert. Dann folgte die Messung von Evans Blue im Plasma und Lungenhomogenisat mit dem Tecan-Reader bei 620nm und 740nm. Das Absorptionsmaximum von Evans Blue ist bei 620nm. Die Absorption von Evans Blue und Lungengewebe wird nach folgender Formel (Korrekte Absorption 620nm = gemessene Absorption 620 -  $[1,426 \times (\text{Absorption bei } 740\text{nm}) + 0,03]$ ) berechnet (31, 32). Das Ausmaß der Evans Blue Extravasation wurde als Ratio der korrekten Absorption im Lungengewebe zur korrekten Absorption im Plasma berechnet.

## **3.12 BCA-Proteinbestimmung**

### **3.12.1 Einleitung**

Die BCA Proteinbestimmung basiert auf eine Biuretreaktion durch eine Komplexbildung von Proteinbindungen mit Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) in alkalischer Lösung mit anschließender Reduktion  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  und einhergehender Reduktion von Molybdän (VI) zu Molybdänblau. Die Molybdän-Reduktion resultiert in einer Blaufärbung, welche mittels photometrischer Bestimmung zur Quantifizierung der Proteinkonzentration genutzt werden kann.

### **3.12.2 Durchführung**

Als Standard wurde Rinder Serumalbumin in 6 Konzentrationen von 0,0625 bis 2mg/ml verwendet. In 96 Well Platten wurden jeweils 25 $\mu$ l Standard oder Probe und 200ml Substratmischung pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte die photometrische Proteinbestimmung mittels Tecan Reader bei 562nm.

Dieses Verfahren wurde sowohl bei der Proteinbestimmung von Western Blot-Proben als auch bei der Proteinbestimmung in der bronchoalveolären Flüssigkeit verwendet.

## **3.13 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)**

### **3.13.1 Einleitung**

Als Elisa versteht man ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren für Proteine mittels einer enzymatischen Farbreaktion. Zu Beginn der Reaktion wurde der passende Antikörper gegen das Protein, welches untersucht werden sollte, auf 96 Well-Platten pipettiert und für 24 Stunden zur Beschichtung auf der Platte inkubiert. Es folgten die Blockade freier Proteinbindungsstellen und dann die Inkubation mit dem Standard beziehungsweise der zur untersuchenden Probe. Nach Waschung der Platten folgte die Inkubation mit den Biotin-gekoppelten Detektions-Antikörpern und mit HRP-Streptavidin. Es folgte die Zugabe vom Farbstoff und in Anwesenheit vom HRP-Streptavidin kam es zu einem

Farbumschlag, welcher mittels ELISA-Reader gemessen wurde. Zusätzlich wurden Standardproben gemessen, eine Standardkurve errechnet und mittels der Standardkurve der Gehalt des zu detektierenden Proteins ermittelt.

### **3.13.2 Durchführung**

Die Freisetzung von inflammatorischen Chemokinen in der bronchoalveolären Lavage im Rahmen der LPS-bedingten pulmonalen Inflammation wurde mittels ELISA quantifiziert. Untersucht wurden die BAL von Wildtyp- und A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach oder ohne LPS -Inhalation. Des Weiteren wurden auch mit den A1AR-Agonisten vorbehandelte Mäuse untersucht. In tiefer Narkose wurde die Trachea freipräpariert und mit einer 24G Verweilkanüle punktiert und fixiert. Mittels einer Spritze wurde 1ml kaltes PBS- langsam injiziert und vorsichtig aspiriert. Dieser Vorgang wurde ein Mal wiederholt bis 2ml BAL Flüssigkeit gewonnen waren. Aufgrund der hohen Konzentration von Chemokinen nach LPS-Exposition wurden 100µl BAL Flüssigkeit in 700µl PBS- verdünnt. Die Proben ohne LPS-Exposition wurden nicht weiter verdünnt. Für die Bestimmung von CXCL1, CXCL2/3, IL-6 und TNFα wurde Sandwich-ELISA verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

## **3.14 Immunhistochemie**

### **3.14.1 Lungenpräparation**

In tiefer Narkose erfolgte die Fixierung der Maus auf dem Rücken auf einem OP-Tisch. Nach Entfernung des Fells vom Unterkiefer bis zum unteren Abdomenbereich, erfolgte die Eröffnung des Thorax, mittels einer medianen Thorakotomie. Dann die Eröffnung des Peritoneums und eine Durchtrennung der Vena cava inferior subdiaphragmal oder alternativ eine subhepatische Durchtrennung aller Gefäße. Der rechte Herzventrikel wurde punktiert und 5ml PBS- wurden ins schlagende Herz injiziert. Dadurch wurde das vorhandene Blut in Kreislauf und Lunge entfernt. Dann folgten die Präparation der Trachea und anschließend die Punktion dieser mit einer Venenverweilkanüle.

Die Kanüle wurde an einem Schlauchsystem angeschlossen und die Lunge wurde mit PFA 4% für 15 Minuten bei konstantem Druck von 20mmHg gespült. Zusätzlich wurde die Lunge von außen mit PFA 4% fixiert.

Es folgte die Präparation der Lunge vom Thorax. Herz und Thymus wurden entfernt und die Lungenhälften getrennt in Histologiekassetten eingelegt. Die Fixierung der Lungenhälften in PFA 4% erfolgte für mindestens 24 Stunden. Anschließend wurden die Präparate für wenige Minuten in 70% Alkohol gelegt und anschließend zur Entwässerung und Paraffinfiltration in den Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten verbracht.

Einbettungsablauf
Ethanol 96% 15 Minuten 37°C
Ethanol 96% 15 Minuten 37°C
Ethanol 100% 60 Minuten 37°C
Ethanol 100% 60 Minuten 37°C
Ethanol 100% 60 Minuten 37°C
Ethanol 100% 60 Minuten 37°C
Xylol 80 Minuten 37°C
Xylol 45 Minuten 37°C
Paraffin links 45 Minuten 61°C
Paraffin mitte 45 Minuten 61°C
Paraffin rechts 45 Minuten 61°C

***Tabelle 4: Einbettungsablauf für Entwässerung und Paraffinfiltration histologischer Präparate.***

Danach konnten die Präparate in Paraffin gelegt und in geeignete Formen gegossen werden. Dazu wurde der Histoembedder mit integrierter Kühlplatte zum Härten des Paraffinblocks verwendet. Nach Auskühlen des Paraffinblocks wurden die Formen entfernt und die Präparate bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Zum Schneiden der vorgekühlten Präparate wurde das Mikrotom von Leica verwendet. Die Schnitte wurden zuerst in gekühltes Wasser und dann in ein Leica-Wärmebad gelegt. Die benötigten Präparate wurden dann auf

Objektträger aufgetragen und auf einer Leica-Wärmeplatte für 24 Stunden zum Trocknen gelegt.

### 3.14.2 Immunhistochemische Färbung von Lungenpräparaten

Für die Entparaffinisierung und Rehydrierung wurden die Objektträger nach folgendem Schema der Tabellen 4 und 5 für je 5 Minuten in Glasbehälter gelegt und geschwenkt.

Rehydrierung
2mal in Xylol
2mal in 100% Ethanol
2mal in 95% Ethanol
2mal in 70% Ethanol
2mal in Aqua dest.

***Tabelle 5: Rehydrierungsablauf von Histologiepräparaten.***

Dann folgte die Blockung der endogenen Peroxidase durch die Inkubation für 30 Minuten mit 200µl Methanol und 3ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zur Beendigung der Blockung wurden die Präparate mit Aqua dest. für 5 Minuten bei Raumtemperatur gespült. Daraufhin wurden die Präparate in einen Glasbehälter mit Unmasking Solution gelegt und für 20 Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Um eine Austrocknung der Präparate zu vermeiden, wurde regelmäßig Unmasking Solution in den Glasbehälter nachgegeben. Zur Abkühlung wurden die Präparate für eine Stunde abgedeckt und bei Raumtemperatur gelagert. Dann erfolgte das Abspülen der Unmasking Solution für 5 Minuten mit PBS- und das Umkreisen der Histologie-Präparate mit einem Pap-Pen. Innerhalb der Umkreisung auf den Präparaten wurde die Avidin-Blocking Solution pipettiert und die Präparate für 1 Stunde in einer feuchten Kammer gelagert. Danach wurde die Avidin-Blocking Solution entfernt und die Präparate für 5 Minuten mit PBS- gespült. Daraufhin wurde die Primär-Antikörper-Solution aufgetragen und im Feuchten über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde der Primär-Antikörper entfernt und die Objektträger mit 0,5% FSGO/PBS- gespült. Danach wurde der Sekundär-

Antikörper aufgetragen und in einer feuchten Kammer für 1 Stunde inkubiert. Danach erfolgten die Entfernung der Antikörperlösung und die Spülung der Präparate mit 0,5% FSGO/PBS- für 5 Minuten. Die ABC-Solution wurde auf die Präparate aufgetragen und in der feuchten Kammer erneut für 30 Minuten gelagert. Anschließend wurde die ABC-Solution entfernt und die Präparate mit PBS- gespült. Auf die Präparate kam die DAB-Solution für 5 Minuten und anschließend erneut mit PBS- für 5 Minuten gespült. Es folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 15 Sekunden und dann für 1 Minute mit Bluing Reagenz mit anschließender Spülung für 3 Minuten mit Wasser. Zum Schluss folgten die Dehydrierung nach Schema der Tabelle 6 und das Eindecken der Objektträger mit den Lungenpräparaten mit Eukitt.

Dehydrierung
2mal in 70% Ethanol
2mal in 95% Ethanol
2mal 100% Ethanol
2mal in Xylol

***Tabelle 6: Dehydrierungsablauf von Histologiepräparaten.***



### **3.15 In vitro Transmigration von neutrophilen Granulozyten**

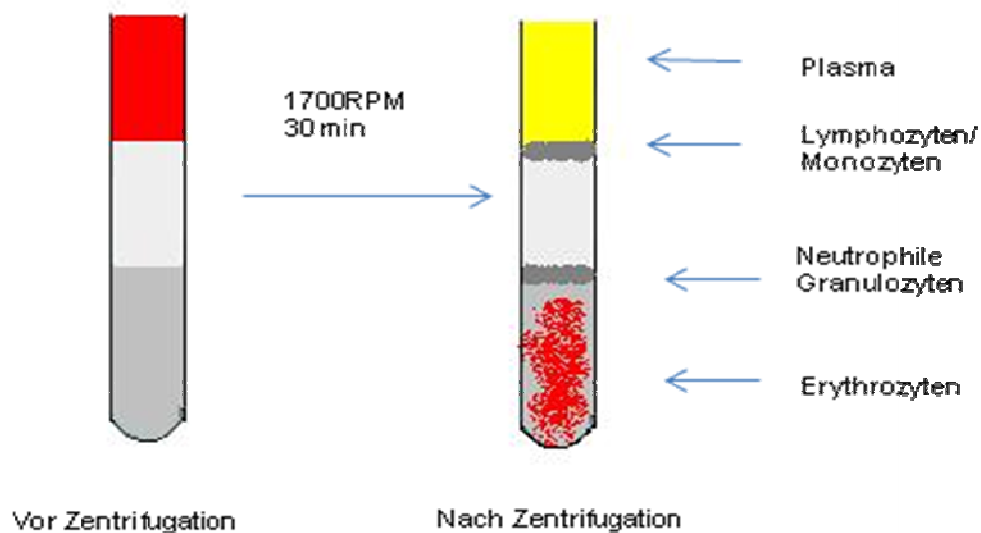
#### **3.15.1 Einleitung**

Neben den in vivo Versuchen sollte die Transmigration von PMNs auch unter in vitro Bedingungen untersucht werden. Ziel dieser Untersuchungen war es die Ergebnisse aus den in vivo-Versuchen auch mit humanen Zellen zu evaluieren. Des Weiteren können die zu untersuchenden Zellen unter in vitro Voraussetzungen gezielter einer pharmakologischen Modulation unterzogen werden.

#### **3.15.2 Isolation von neutrophilen Granulozyten**

Venöses Blut wurde von gesunden Freiwilligen in Citratröhrchen mittels einer Einwegkanüle entnommen und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Dann wurden die Percoll-Röhrchen vorsichtig mit je 4ml Percoll 72%, Percoll 63% und Vollblut befüllt. Dann erfolgte die Zentrifugation mit 1700 RPM für 30 Minuten ohne Bremse und bei Raumtemperatur. Durch die Zentrifugation kam es zu einer Zellseparation und es erschienen zwei deutlich sichtbare Banden. In der zweiten Bande befanden sich die neutrophilen Granulozyten. Zuerst wurden das Plasma und die Lymphozyten/Monozyten-Bande abgesaugt und verworfen. Mit einer Glaspipette wurde die Bande mit neutrophilen Granulozyten abpipettiert und in ein vorgekühltes 50ml Falcon-Röhrchen überführt.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Isolation neutrophiler Granulozyten.**

Bis zu 15ml Granulozyten-Suspension wurden pro Falcon-Röhrchen gepoolt und auf Eis für 15 Minuten mit Lyse-Lösung versetzt. Erneut wurde die Zellsuspension zentrifugiert für 10min, 1100RPM bei 4°C. Die Flüssigkeit wurde dann verworfen und am Boden des Röhrchens blieben die PMNs übrig. Diese wurden mit 5ml HBSS ohne  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  resuspendiert, davon wurden 10 $\mu$ l für die Zellbestimmung entnommen und in einem 1ml Eppendorf Röhrchen mit 90 $\mu$ l Türk'sche Lösung resuspendiert.

Rechnung = Zellzahl x 2,5 x 10 x 1000 x 5

2,5 = Faktor der Zählkammer

10 = Faktor der Verdünnung

1000 = Faktor auf 1ml gerechnet

5 = Anzahl der Milliliter der Zellsuspension

**Tabelle 7: PMN Zellzählung.**

Für die Waschung erfolgte die Resuspension mit 45ml HBSS ohne  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  und die erneute Zentrifugation für 10min mit 1100 RPM bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet auf Eis aufbewahrt. Nach der Zellzählung wurde das PMN-Pellet mit HBSS ohne  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  resuspendiert, um die benötigte PMN-Anzahl von  $4 \times 10^6$  in 100 $\mu$ l zu erreichen.

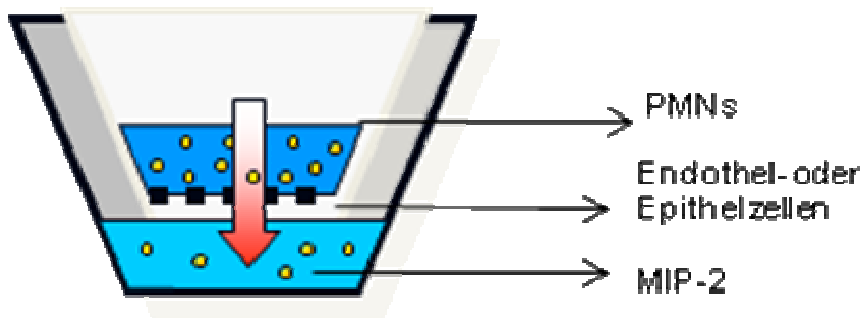
### **3.15.3 Vorbereitungen für die in vitro-Transmigration**

Je 500 $\mu$ l der PMN-Suspension wurden in 1,5ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert und für 6min mit 1100RPM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das PMN-Pellet mit 1ml 2`Me-CCPA (0,1ng/ml, 1ng/ml und 10ng/ml) resuspendiert und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert und mit 500 $\mu$ l HBSS ohne  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  resuspendiert.

Die Vorbehandlung der HMVEC-L- und A549-Zellen mit den 2`Me-CCPA wurde nach dem gleichen Verfahren durchgeführt. Zuerst wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit 1ml 2`Me-CCPA (0,1ng/ml, 1ng/ml und 10ng/ml) für 30 min bei Raumtemperatur behandelt.

### **3.15.4 Messung**

In Transwellplatten wurden in die äußeren Wells 200ng/ml MiP-2 pipettiert und ein Filter aufgelegt. Auf den Filter wurde die Zellsuspension pipettiert und dann für eine Stunde bei 35RPM in 37°C auf den Thermoschüttler gelegt. Daraufhin wurde der Filter entfernt und in den Transwellplatten wurden mit einer Mehrhubpipette 50 $\mu$ l Citratpuffer und 50 $\mu$ l Triton X hinzugefügt und für 20min auf die Schwenkplatte gelegt. In 96 Well-Platten wurden Triplets mit je 50 $\mu$ l der Zellsuspension pipettiert und vor der Messung noch 75 $\mu$ l ABTS-Lösung hinzugefügt. Die Messung fand mit dem Tecan-Reader bei 405nm statt.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der in vitro Transmigration von PMNs (Mit freundlicher Genehmigung Prof. Reutershan).**

### 3.16 Aktinzytoskelettales Remodelling

#### 3.16.1 Einleitung

Zytoskelettale Veränderungen für eine gerichtete Bewegung sind Grundvoraussetzung für die Migration von Leukozyten in Inflammationsprozessen. Des Weiteren führen Inflammationsprozesse zu Störungen in der Zell- beziehungsweise Flüssigkeitsbarriere, welche auf das zelluläre Remodelling zurückzuführen sind. Das zytoskelettale Remodelling erfolgte mittels Nachweis von LPS-bedingten Stressfasern (Stress fibers). Des Weiteren untersuchten wir die Effekte der Vorbehandlung mit dem spezifischen A1AR-Agonisten.

#### 3.16.2 Durchführung

Humane Endothel- (HMVEC-L) oder Epithelzellen (A549) wurden in speziellen  $\mu$ -Slide-Kammern ausgesät und für 2 Tage kultiviert. Insgesamt wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen in  $30 \mu\text{l}$  ausgesät und für 60 Minuten belassen, damit sie adhären können. Danach wurden  $60 \mu\text{l}$  10% FBS hinzugefügt und die Platte über Nacht inkubiert. Zu Beginn der Untersuchungen wurde das Medium entfernt und in entsprechenden Gruppen der A1AR-Agonist hinzugefügt ( $100 \text{ ng/ml}$ ) und 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Es folgte die Stimulation und Inkubation mit LPS ( $100 \text{ ng/ml}$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  für vorgegebene Zeiten. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, mit  $200 \mu\text{l}$  HBSS gewaschen und dann für 10 Minuten mit  $100 \mu\text{l}$  3,7% PFA-Lösung zur Zellfixierung inkubiert. Es folgte die

Permeabilisierung mit 100µl Triton-X-Lösung, erneutes Auswaschen mit 200µl HBSS und die Inkubation mit 100µl 1% BSA-Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde der Überstand abpipettiert und es folgte die Färbung mit 25µl FITC-Phalloidin Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen drei Mal mit 200ml HBSS gewaschen. Es folgte die Kernfärbung mit 25µl DAPI-Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit anschließendem 3-maligem Auswaschen mit 200µl HSS. Die Eindeckung der Proben erfolgte mit 30µl Glycerol. Als letzter Schritt folgten die Darstellung der Epithel- und Endothelzellen unter dem konfokalen Fluoreszenz Mikroskop und die Dokumentation der zytoskelettalen Veränderungen.

### **3.17 Statistik**

Die statistische Auswertung aller Ergebnissen erfolgte mit GraphPad Prism (Version 5.0) unter Verwendung einer Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit anschließendem post hoc Tukey-Test. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung präsentiert, und als Signifikanzwert wurde ein  $p < 0.05$  festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Differentialblutbild

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung eines Rezeptors zu Veränderungen der Hämatopoese führen und es somit zu Veränderungen der Leukozytenpopulationen kommen kann (4, 19).

Bei den  $A1AR^{-/-}$ -Mäusen konnten im Differentialblutbild kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe aus Wildtyp-Mäusen beobachtet werden.

	<b>A1AR<sup>+/+</sup></b>	<b>A1AR<sup>-/-</sup></b>	<b>P</b>
Leukozyten	8,5 ± 0,2 x 10 <sup>3</sup> /μl	9,58 ± 0,9 x 10 <sup>3</sup> /μl	ns
Neutrophile			
Granulozyten	1,9 ± 0,2 x 10 <sup>3</sup> /μl	1,7 ± 0,2 x 10 <sup>3</sup> /μl	ns
Lymphozyten	6,1 ± 0,2 x 10 <sup>3</sup> /μl	7,4 ± 0,6 x 10 <sup>3</sup> /μl	ns
Monozyten	0,3 ± 0,3 x 10 <sup>3</sup> /μl	0,4 ± 0,3 x 10 <sup>3</sup> /μl	ns
Neutrophile			
Granulozyten (%)	23,0 ± 1,4	17,7 ± 0,9	ns
Lymphozyten (%)	71,7 ± 3,3	77,0 ± 1,6	ns
Monozyten(%)	4,5 ± 3,4	4,5 ± 2,6	ns

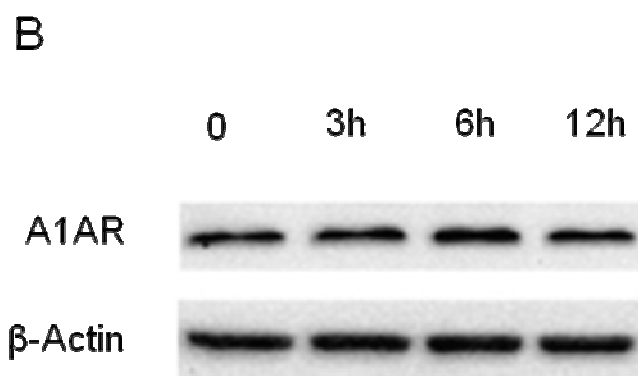
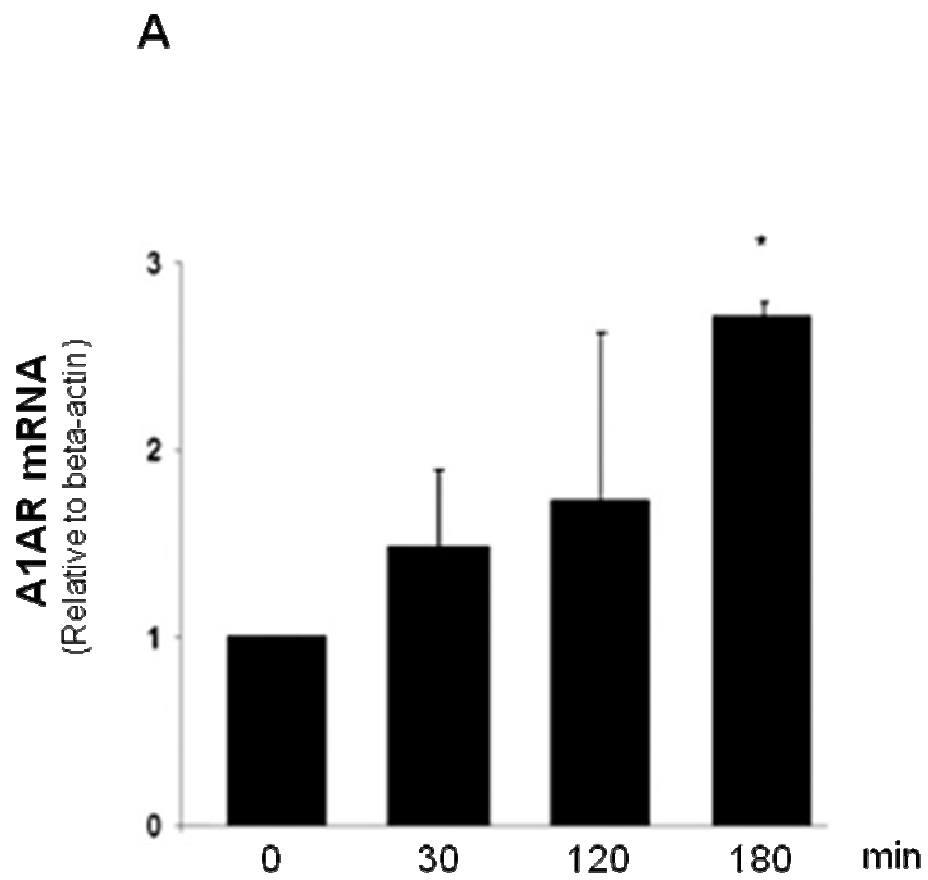
**Tabelle 8: Differentialblutbild von Wildtyp-(A1AR<sup>+/+</sup>) und A1-Adenosinrezeptor Knockout (A1AR<sup>-/-</sup>)-Mäusen.**

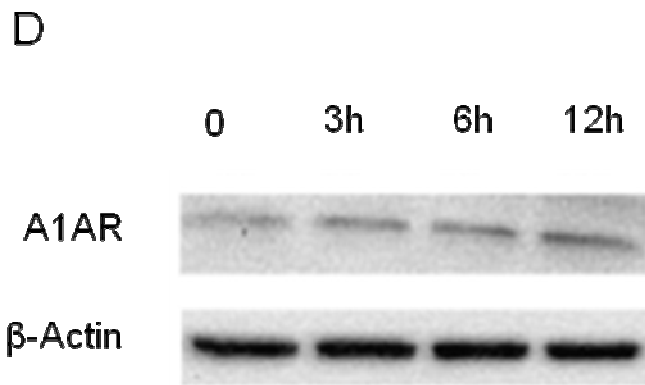
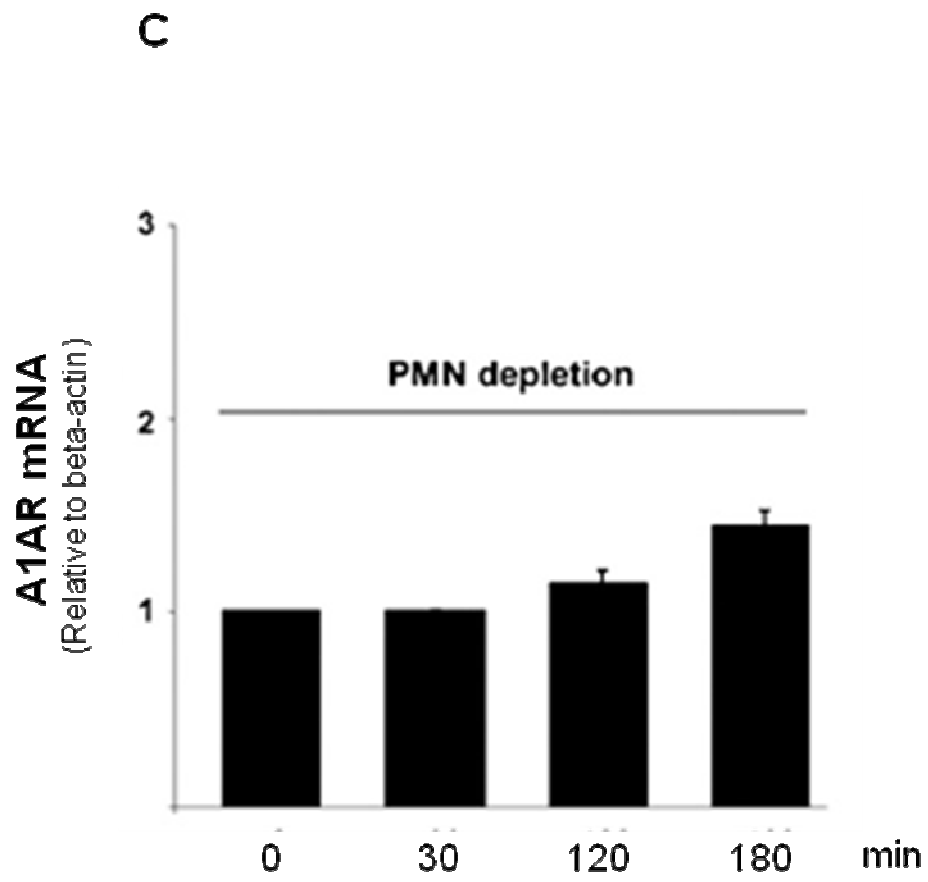
Die Daten werden in Mittelwerte ± Standardabweichung präsentiert (n = 4 Mäuse), ns= nicht signifikant.

### 4.2 LPS-bedingte Steigerung der A1AR mRNA und Protein-Expression

Die LPS-Inhalation induzierte eine gesteigerte mRNA und Protein-Expression von Adenosinrezeptor A1 (Abbildung 8 A + B).

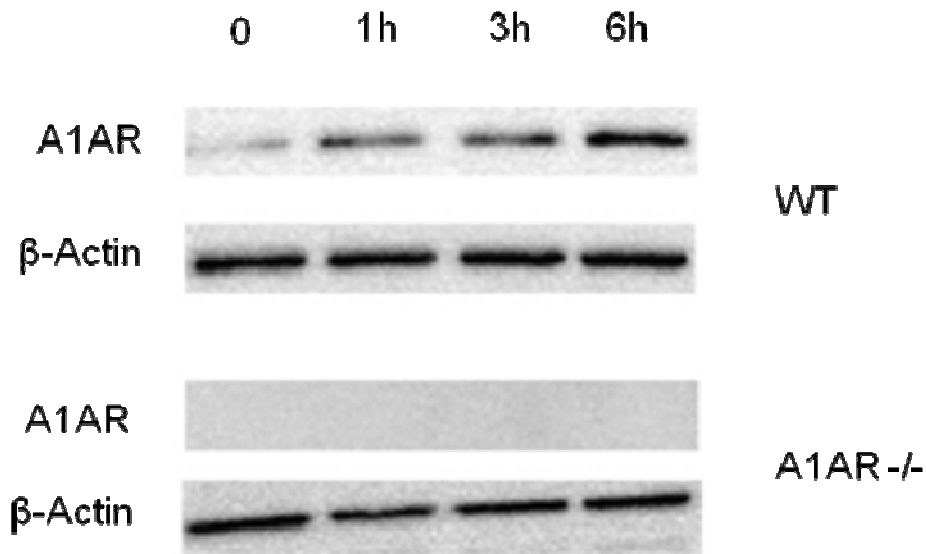
Im Gegensatz dazu resultierte die PMN-Depletion vor der LPS-Inhalation in einer signifikant reduzierten mRNA- und Protein-Expression von A1AR (Abbildung 8 C + D). Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Protein-Expression von A1AR bei Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nicht vorhanden war (Abbildung 8 E).







E

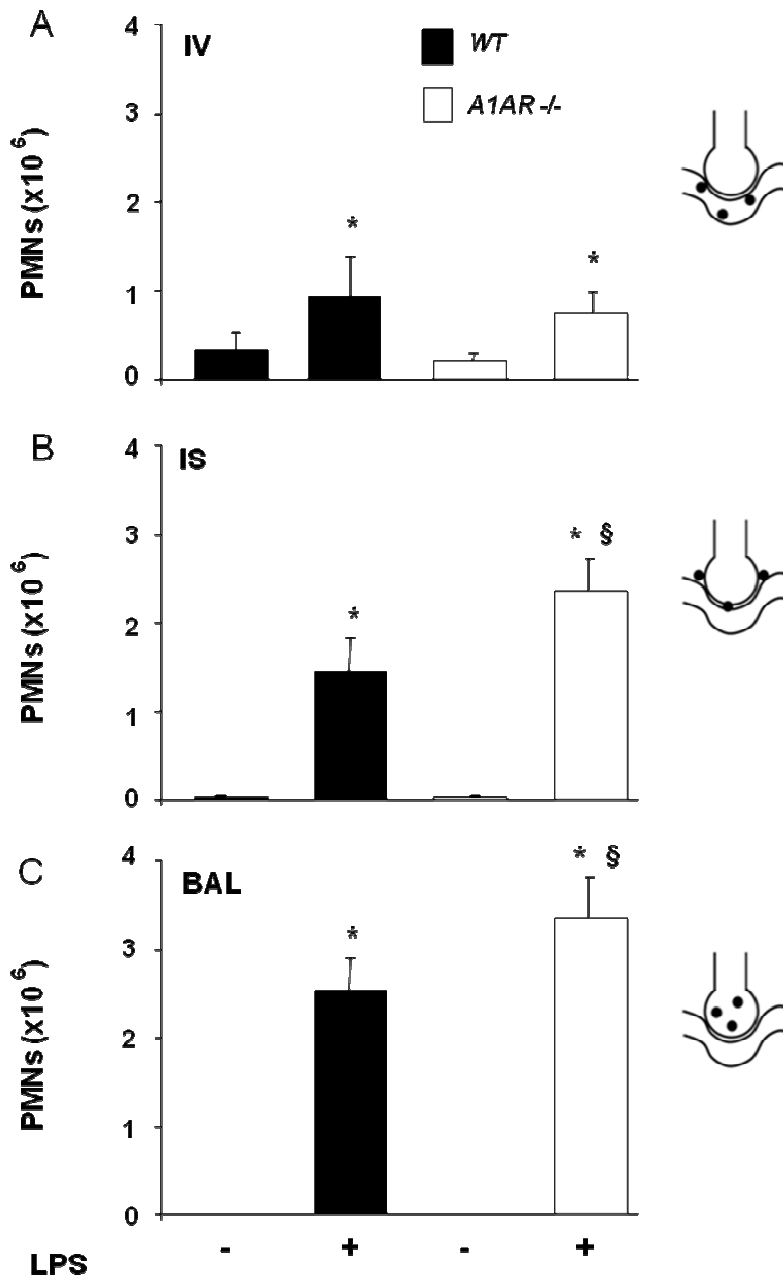


**Abbildung 8: LPS-induzierte A1AR mRNA und Proteinexpression in WT- und A1AR<sup>-/-</sup>-Mauslungen.**

LPS-Exposition induzierte bei WT-Mäusen A1AR mRNA- und Proteinexpression (A, B). PMN Depletion resultierte in einer Reduktion der A1AR mRNA und Proteinexpression (C, D). Murine PMNs von WT-Mäusen zeigten LPS-bedingt eine erhöhte A1AR Proteinexpression. Im Vergleich konnten solche Effekte bei A1AR<sup>-/-</sup> murinen PMNs nicht beobachtet werden. Entnommen aus (33).

### **4.3 LPS-bedingte Migration neutrophiler Granulozyten in die Lungenkompartimente von Wildtyp- und A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Mittels eines durchflusszytometrischen Verfahrens wurde die Anzahl von PMNs im Intravaskularraum (IV), Interstitium (IS) und Alveolarraum (BAL) bestimmt. Die LPS-Inhalation induzierte sowohl in Wildtyp- als auch in A1AR-KO-Mäusen eine signifikante Steigerung der Migration von PMNs in allen 3 Lungenkompartimenten. In den Kontrollgruppen ohne LPS-Exposition konnte bei Wildtyp und A1AR-KO-Mäusen keine gesteigerte Anzahl von PMNs in der Lunge beobachtet werden. Interessanterweise war in der A1AR-KO-Mausgruppe nach LPS-Inhalation die Anzahl der PMNs in Interstitium und BAL signifikant höher als in der korrespondierenden Wildtyp-Gruppe (IS:  $2,4 \pm 0,4 \times 10^6$  versus  $1,5 \pm 0,4 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ; BAL:  $3,4 \pm 0,4 \times 10^6$  versus  $2,5 \pm 0,4 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 9 B). Die Anzahl adhärenter PMNs in dem Intravaskularraum bei der A1AR<sup>-/-</sup>-Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der Wildtyp-Gruppe nach LPS-Inhalation (Abbildung 9 C).



**Abbildung 9: Erhöhte PMN-Akkumulation bei A1-gendefiziente Mäusen nach LPS-Exposition.**

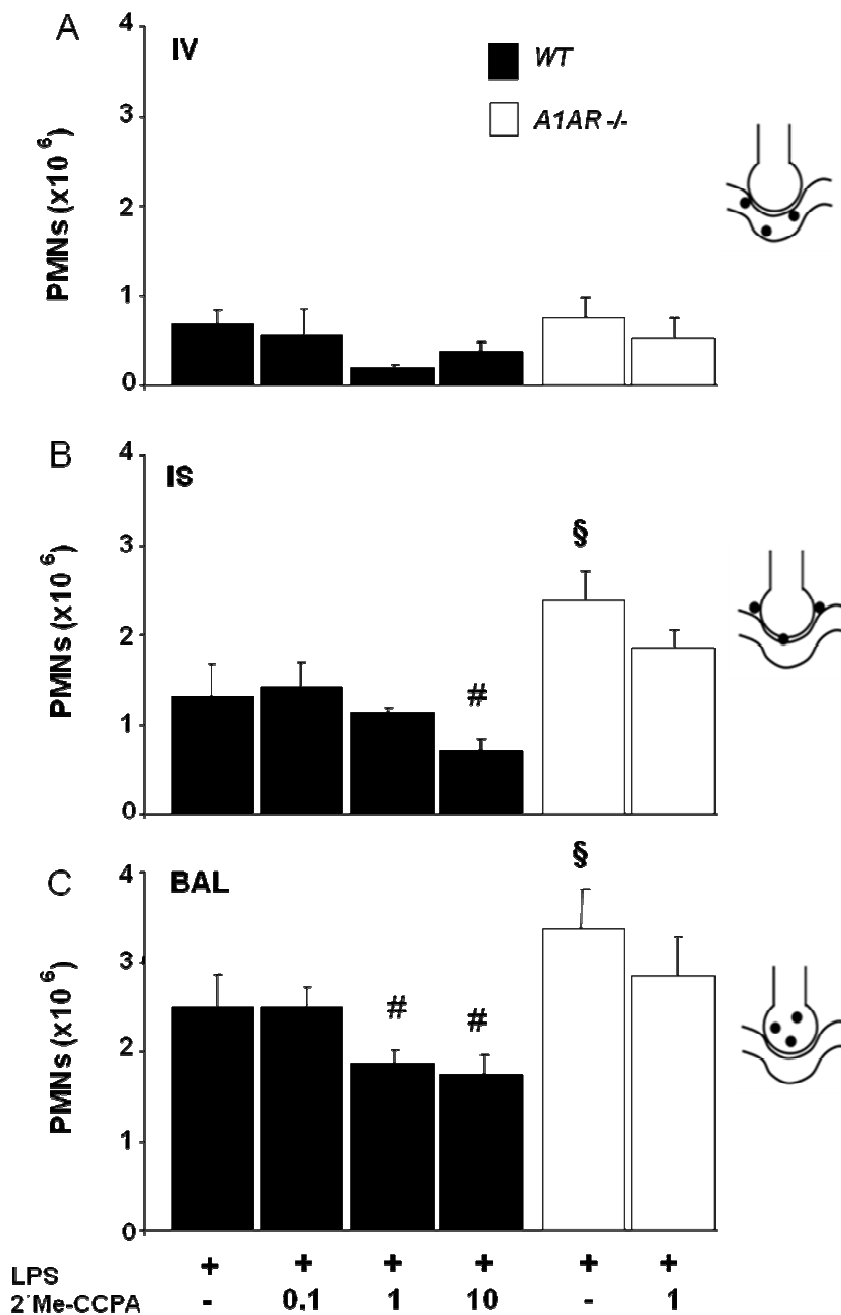
Durchflusszytometrische Bestimmung der LPS-bedingten Migration neutrophiler Granulozyten in den Lungekompartimenten von Wildtyp- (schwarze Balken) und A1AR<sup>-/-</sup>-(weiße Balken) Mäusen. Alle Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichung von 4 Mäusen pro Gruppe. \*  $p < 0.05$  versus jeweilige negativ Kontrollgruppe ohne LPS-Exposition. §  $p < 0.05$  A1AR<sup>-/-</sup> mit LPS-Exposition versus Wildtypgruppe mit LPS-Exposition. Entnommen aus (33).

#### **4.4 Pharmakologische Aktivierung von Adenosinrezeptor A1 reduziert die LPS-bedingte Migration neutrophiler Granulozyten in der Lunge**

Die pharmakologische Modulation von A1AR durch den hochselektiven A1-Agonisten 2´Me-CCPA induzierte bei Wildtyp-Mäusen eine Reduktion von neutrophilen Granulozyten. Dabei konnte bei den Wildtyp-Mäusen eine dosisabhängige Reduktion der PMN-Migration im Interstitium und im bronchoalveolären Raum gezeigt werden. Die intraperitoneale Gabe von 10mg/kg und 1mg/kg 2´Me-CCPA reduzierte signifikant die transepitheliale Migration neutrophiler Granulozyten zum bronchoalveolären Raum ( $1,7 \pm 0,2 \times 10^6$  versus  $2,5 \pm 0,3 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ;  $1,9 \pm 0,1 \times 10^6$  versus  $2,5 \pm 0,3 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ).

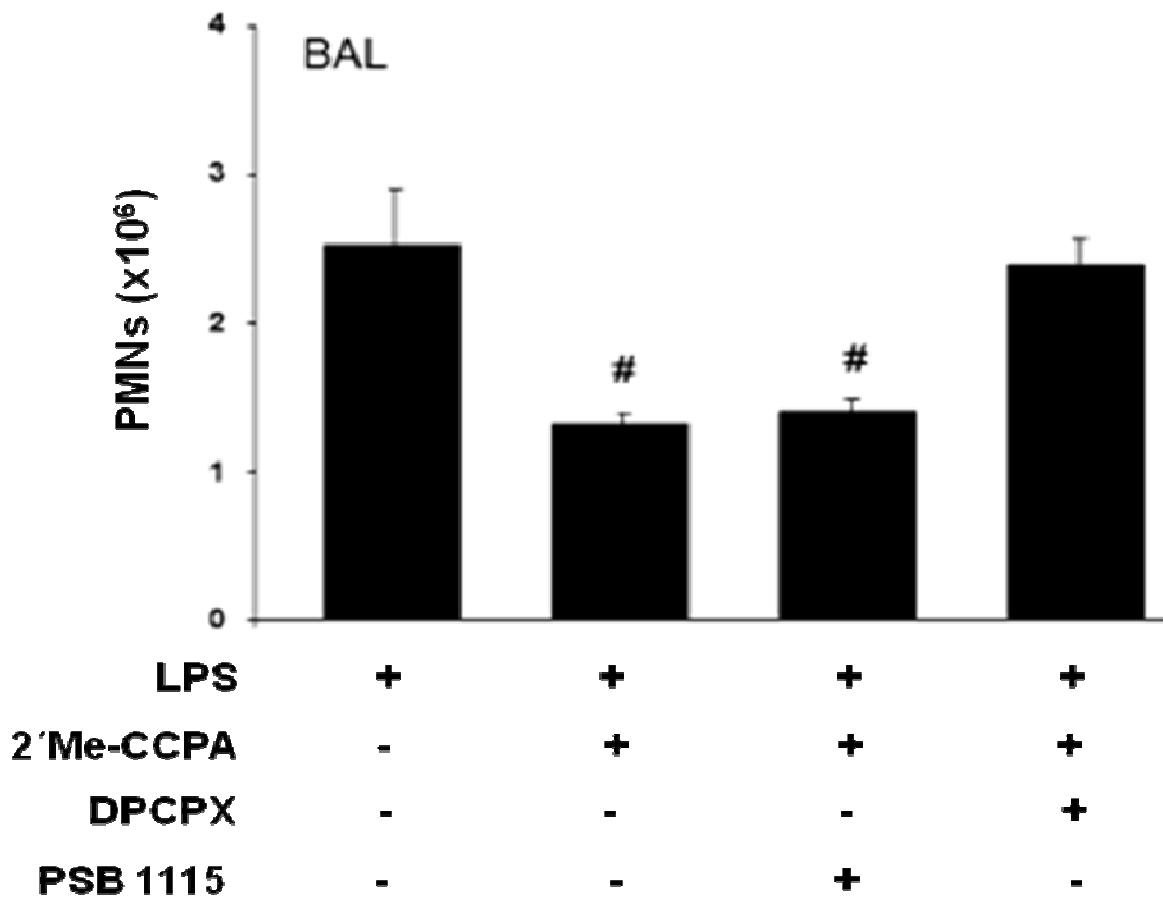
Die pharmakologische Modulation von A1AR konnte nur in der höchsten Dosierung mit 2´Me-CCPA (10mg/kg) die PMN-Akkumulation im Interstitium signifikant reduzieren ( $0,7 \pm 0,2 \times 10^6$  versus  $1,3 \pm 0,4 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ). In der Anzahl der adhären PMNs im Intravaskularraum konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Um unspezifische Effekte des A1-Agonisten auszuschließen, wurden auch A1AR<sup>-/-</sup>-Mäuse mit den 2´Me-CCPA vorbehandelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es zwar zu einer allgemeinen Reduktion der PMN-Akkumulation in allen drei Lungenkompartimenten kam, aber ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 10).

Um mögliche unspezifische Effekte des 2´Me-CCPA an den A2bAR auszuschließen, wurden die Effekte von A1AR-Agonisten (2´Me-CCPA), A1AR-Antagonisten (DPCPX) und A2bAR-Agonisten (PSB1115) in separaten Versuchsgruppen untersucht (Abbildung 11). Dabei wurden der A1AR-Antagonist (1mg/kg KG) und A2bAR-Antagonist (1mg/kg KG) jeweils vor dem A1AR-Agonisten intraperitoneal appliziert. Die Vorbehandlung mit dem A2bAR-Antagonist konnte die Effekte des A1AR-Agonisten in der PMN-Migration im bronchoalveolären Raum nicht beeinflussen, während die Vorbehandlung mit dem A1AR-Antagonisten die Effekte des 2´Me-CCPA komplett aufgehoben hat.



**Abbildung 10: Modulation des A1AR reduziert die PMN-Migration bei Wildtyp-Mäusen.**

Pharmakologische Modulation der LPS-bedingten PMN Akkumulation in allen Lungenkompartimenten in Wildtyp- (schwarze Balken) und A1AR<sup>-/-</sup>- (weiße Balken) Mäusen. Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4 Mäuse) präsentiert. # p<0,05 versus LPS-behandelte Wildtyp-Gruppe ohne Vorbehandlung mit 2'Me-CCPA; § p<0,05 versus Wildtyp-Mausgruppe mit LPS-Exposition ohne 2'Me-CCPA Vorbehandlung. Entnommen aus (33).



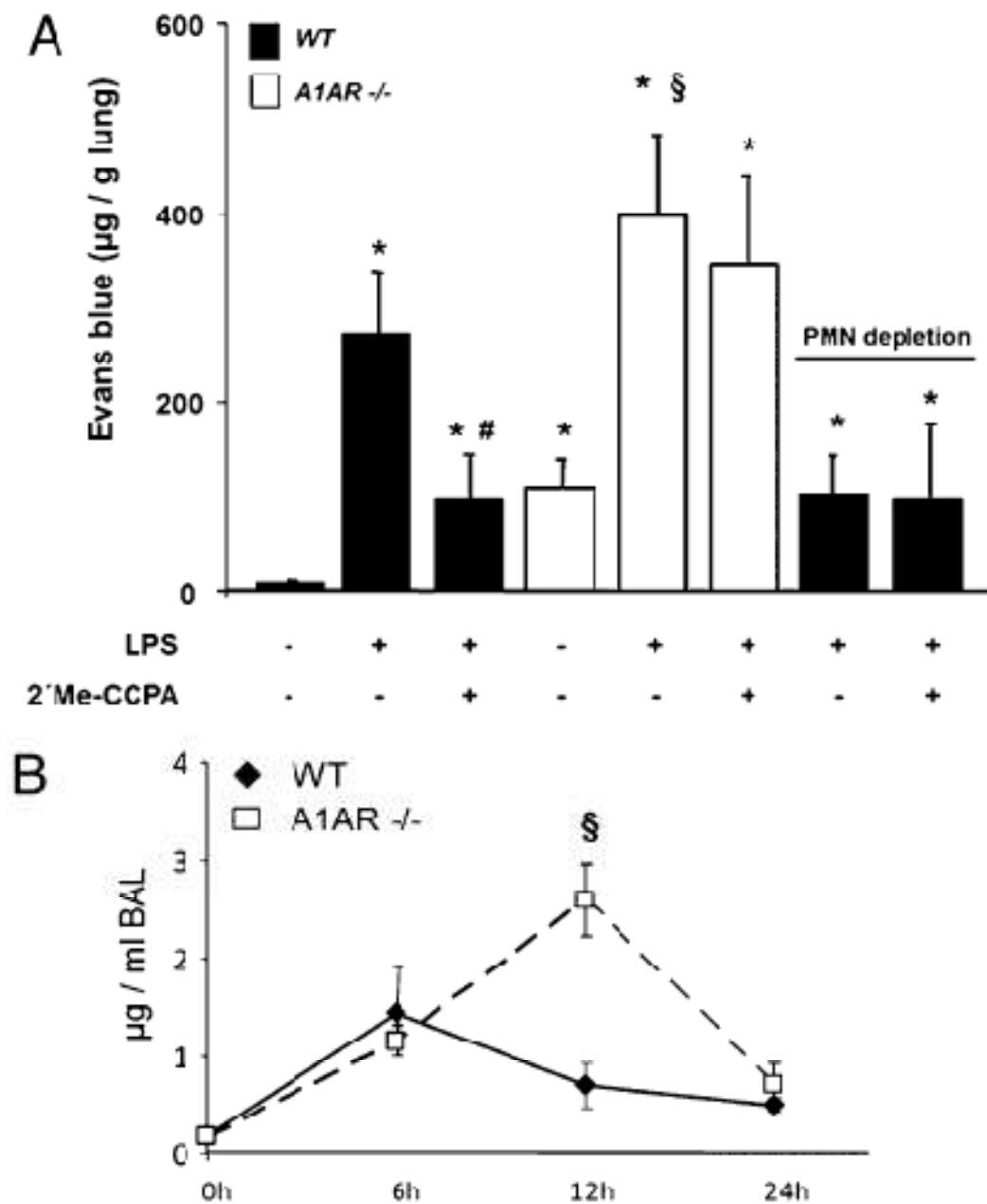
**Abbildung 11: Ausschluss unspezifischer Effekte des 2'Me-CCPA auf den Adenosinrezeptor A2b.**

Zum Ausschluss von unspezifischen Effekten von 2'Me-CCPA wurden die Effekte des A1AR-Agonisten bei gleichzeitiger Gabe von A1AR-Antagonisten (DPCPX) oder A2b-Antagonisten (PSB1115) untersucht. Die LPS-bedingte PMN Akkumulation wurde in der bronchoalveolären Flüssigkeit untersucht. Daten werden als Mittelwerte mit Standardabweichung präsentiert (n = 4 Mäuse). # p<0,05 versus Wildtypgruppe mit LPS-Exposition ohne 2'Me-CCPA Vorbehandlung. Entnommen aus (33).

#### **4.5 A1AR-Aktivierung reduziert die LPS-bedingte Steigerung der mikrovaskulären Permeabilität**

Die Bildung eines nicht kardiogenen Lungenödems aufgrund der Zerstörung der mikrovaskulären Permeabilität gehört zu den wichtigen Merkmalen des ARDS. Die Effekte des A1AR in der LPS-bedingten Störung der alveolokapillären Barriere wurden mittels Evans Blue-Extravasation und BAC-Proteinbestimmung evaluiert. Die LPS-Inhalation induzierte sowohl bei Wildtyp- als auch bei A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen eine erhöhte Evans Blue Extravasation. Dabei war die Bestimmung von Evans Blue bei den A1AR<sup>-/-</sup>-signifikant höher als bei den Wildtyp-Mäusen (397 ± 88 versus 271 ± 66 µg/g lung; p<0,05). Die Behandlung mit den 2'Me-CCPA (1mg/kg) induzierte nur bei den Wildtyp-Mäusen eine signifikante Reduktion der Extravasation (96 ± 49 versus 271 ± 66 µg/g lung; p<0,05). Die Vorbehandlung mit 2'Me-CCPA (1mg/kg KG) zeigte bei den A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Effekte bei der Plasma Extravasation (347 ± 94 versus 397 ± 88; kS). Interessanterweise führte eine PMN-Depletion bei Wildtyp-Mäusen zu einer deutlich reduzierten Evans Blue-Extravasation. In einer weiteren PMN depletierten Wildtyp-Mausgruppe zeigte die Vorbehandlung mit 2'Me-CCPA keine Effekte mehr.

Zur Bestätigung der vorliegenden Ergebnisse wurde, mittels BAC-Reaktion der Proteingehalt in der bronchoalveolären Flüssigkeit bei Wildtyp- und A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen bestimmt. Es kam in beiden Mausgruppen zu einem LPS-bedingten Anstieg des Proteingehalts in der BAL. Im zeitlichen Verlauf nach 12 Stunden stieg nur bei den A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant der Proteingehalt in der BAL gegenüber den WT-Mäusen an (2,59 ± 0,37 versus 0,70 ± 0,23 µg/ml; § p<0,05).



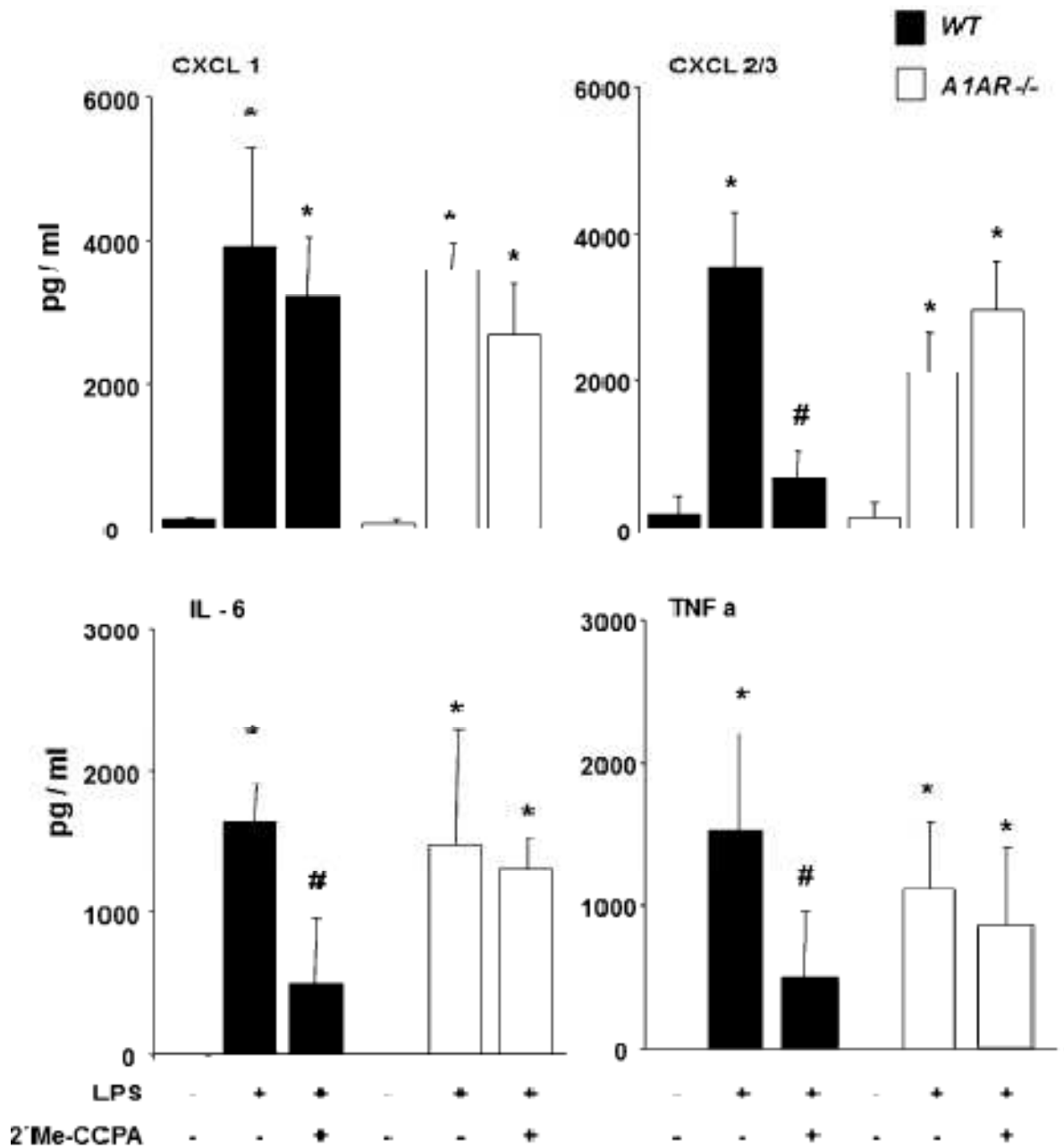
**Abbildung 12: Reduktion der Hyperpermeabilität durch 2'Me-CCPA**

Bestimmung der Evans Blue-Extravasation 6h nach LPS-Inhalation (A) und Proteinbestimmung in der BAL (B) zu verschiedenen Zeiten bei Wildtyp- (schwarze Balken) und A1AR<sup>-/-</sup>- (weiße Balken) Mäusen. Reduktion der Evans Blue Extravasation nach Vorbehandlung mit 2'Me-CCPA und der Einfluss der PMN-Depletion auf die mikrovaskuläre Permeabilität (n = 4 Mäuse). \* p<0,05 versus Wildtypgruppe ohne LPS-Exposition, # p<0,05 versus Wildtyp-Mausgruppe mit LPS-Exposition ohne 2'Me-CCPA-Vorbehandlung, § p<0,05 versus Wildtypgruppe mit gleichen Konditionen. Entnommen aus (33).



#### **4.6 Reduktion inflammatorischer Chemokinen nach Behandlung mit 2'Me-CCPA**

Direkte und indirekte Schädigungen der Lunge induzieren die Freisetzung von inflammatorischen Chemokinen im Alveolarraum. Inflammatorische Chemokine sind essentiell für die Chemotaxis und Migration von aktivierten PMNs in die Lunge. Wir untersuchten die LPS-bedingte Freisetzung von CXCL1, CXCL2/3, TNF-a und IL-6 in der bronchoalveolären Flüssigkeit bei Wildtyp-(schwarze Balken) und A1AR<sup>-/-</sup>-(weiße Balken) Mäusen (Abbildung 13). Die LPS-Exposition induzierte sowohl WT- als auch bei A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikant gesteigerte Freisetzung aller untersuchten Chemokine. Die Vorbehandlung mit 2'Me-CCPA (1mg/kg KG, intraperitoneal) reduzierte signifikant die Ausschüttung von CXCL2/3 (660 ± 380 versus 3555 ± 753 pg/ml BAL, \* p<0,05), TNF-a (550 ± 450 versus 1532 ± 664 pg/ml BAL, \* p<0,05) und IL 6 (505 ± 450 versus 1640 ± 261 pg/ml BAL, \* p<0,05) nur bei Wildtyp-Mäusen. Die Vorbehandlung mit 2'Me-CCPA zeigte bei der Ausschüttung von CXCL1 keine Effekte (3685 ± 456 versus 3985 ± 645 pg/ml BAL, keine Signifikanz). Im Gegensatz dazu zeigte die Modulation mit 2'Me-CCPA bei A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Veränderung bei der Freisetzung der untersuchten Chemokine.

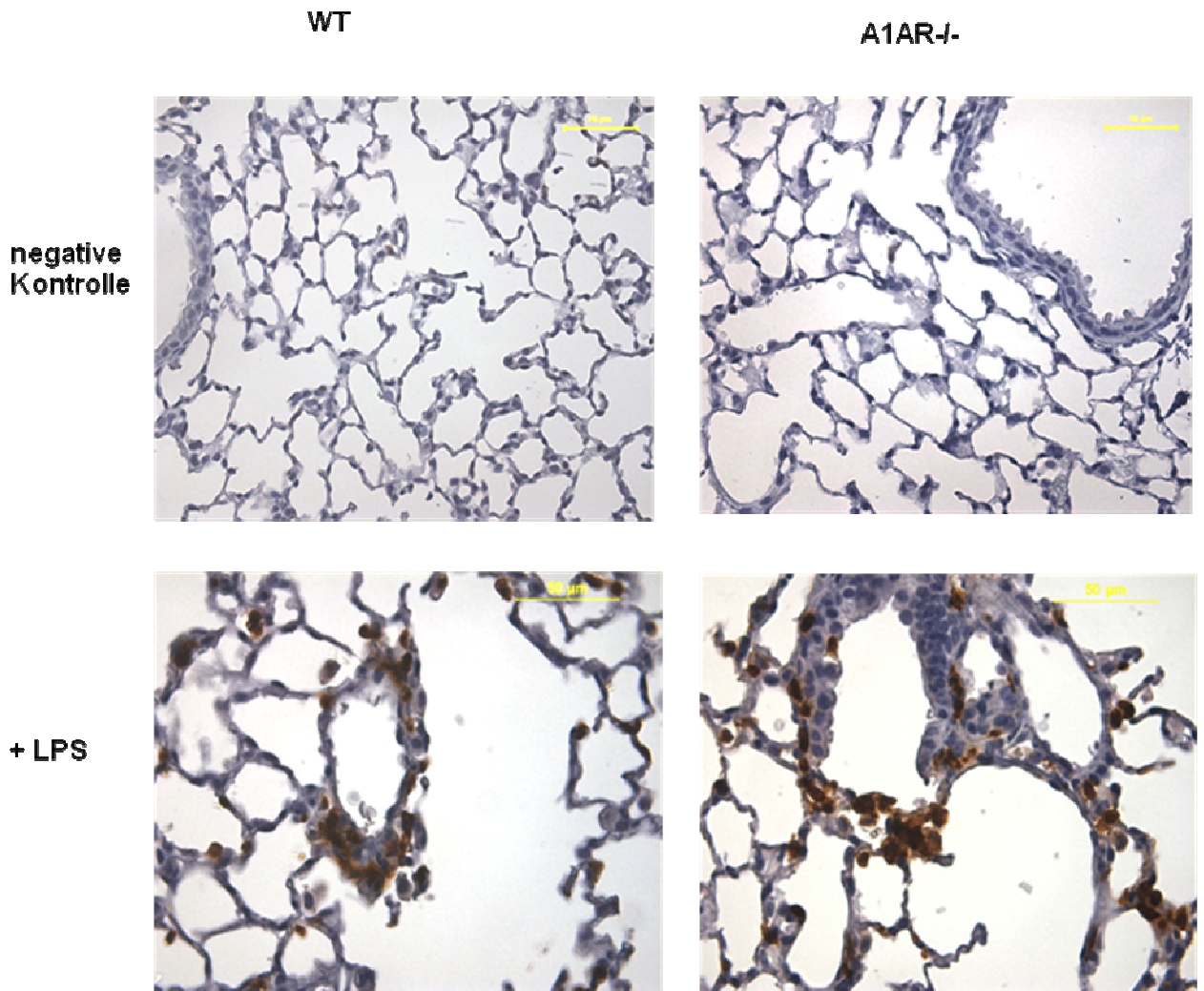


**Abbildung 13: 2'Me-CCPA reduziert die Freisetzung inflammatorischer Chemokine.**

Einfluss des A1AR-Agonisten bei der LPS-induzierten Freisetzung von inflammatorischen Chemokinen in der BAL von WT- (schwarze Balken) und A1AR<sup>-/-</sup>- (weiße Balken) Mäusen. Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4 Mäuse). \* p<0,05 versus negativ Gruppe ohne LPS-Inhalation, # p<0,05 versus LPS-exponierte Mäuse aus der eigene Gruppe ohne 2'Me-CCPA-Vorbehandlung. Entnommen aus (33).

#### 4.7 Immunhistochemische Veränderungen bei A1AR Knockout-Mäusen

Immunhistochemisch wurde die LPS-induzierte Migration von PMNs in WT- und A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen dargestellt. Dabei wurden speziell die PMNs mit Anti-Granulozyten-Antikörpern markiert. Auch immunhistochemisch zeigen A1-gendefiziente Mäuse eine höhere PMN Akkumulation und erhöhte Destruktion des pulmonalen Gewebes nach LPS-Exposition.

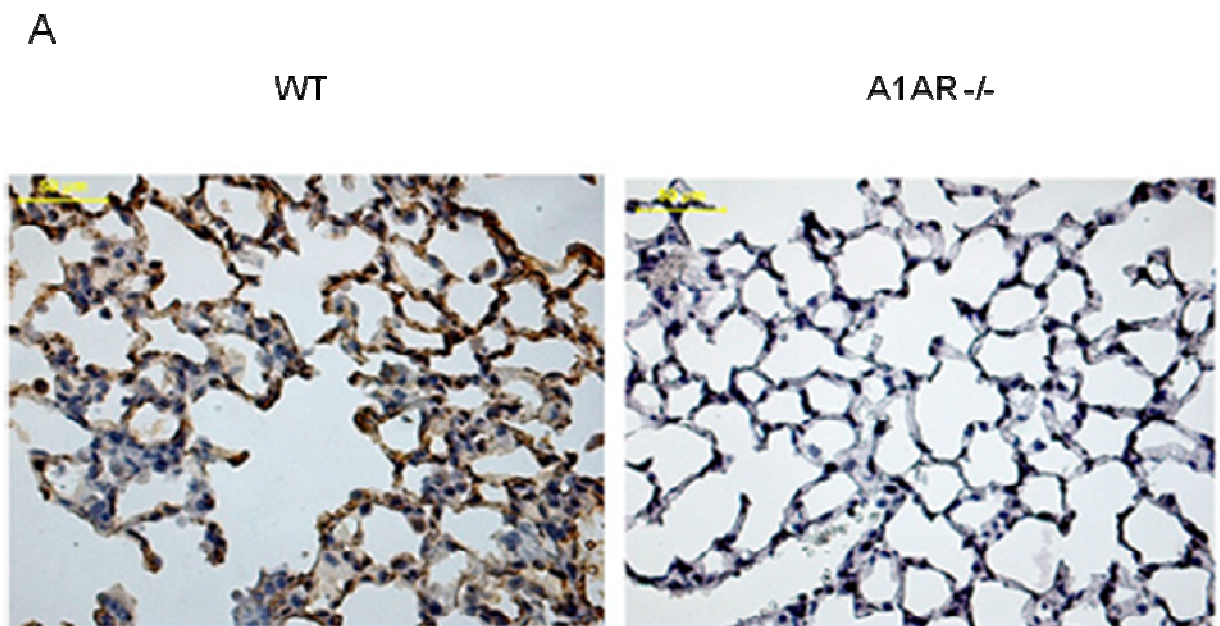


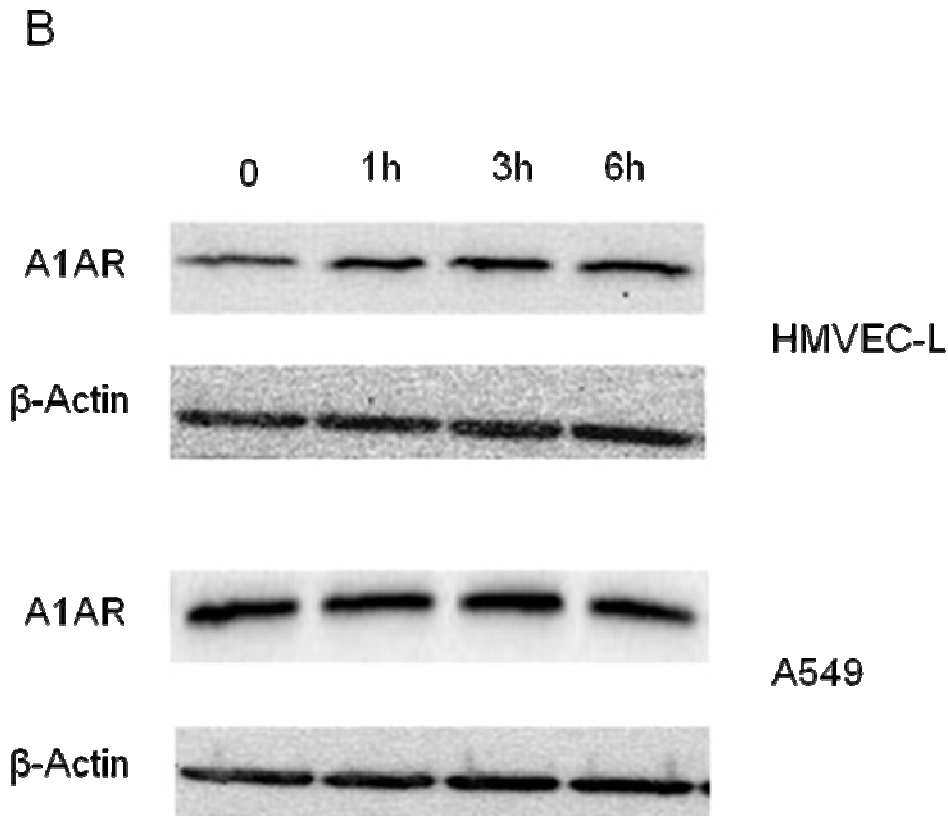
**Abbildung 14: Immunhistochemische Darstellung der PMN Infiltration in WT- und A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach LPS-Exposition**

Lungenpräparate von WT- und A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne LPS-Exposition wurde als negative Kontrolle verwendet. Die Markierung der PMNs erfolgte mit einem spezifischen Antikörper für neutrophile Granulozyten (7/4-Antikörper, braune Zellen). Die Abbildungen (40-fache Vergrößerung) sind repräsentativ für 4 Lungenpräparate mit ähnlichen Ergebnissen. Entnommen aus (33).

#### 4.8 Die Effekte von 2´Me-CCPA bei der PMN-Migration bei chimären Mäusen

Zur genauen Abklärung ob hämatopoetische oder nicht-hämatopoetische Zellen bei der Modulation des A1AR die entscheidende Rolle spielen, wurde die *in vivo* PMN-Transmigration bei chimären Mäusen untersucht. Dabei wurde vorher die Expression von A1AR nach LPS-Exposition immunhistochemisch dargestellt. Bei Wildtyp-Mäusen konnte eine LPS-bedingte Expression in den Alveolarsepten beobachtet werden. Wie erwartet konnte bei den A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen eine Expression des Rezeptors immunhistochemisch nicht dargestellt werden (Abbildung 15 A). Die LPS-bedingte Expression von A1AR bei humanen Endothel- und Epithelzellen wurde mittels Western Blot bestimmt (Abbildung 15 B).



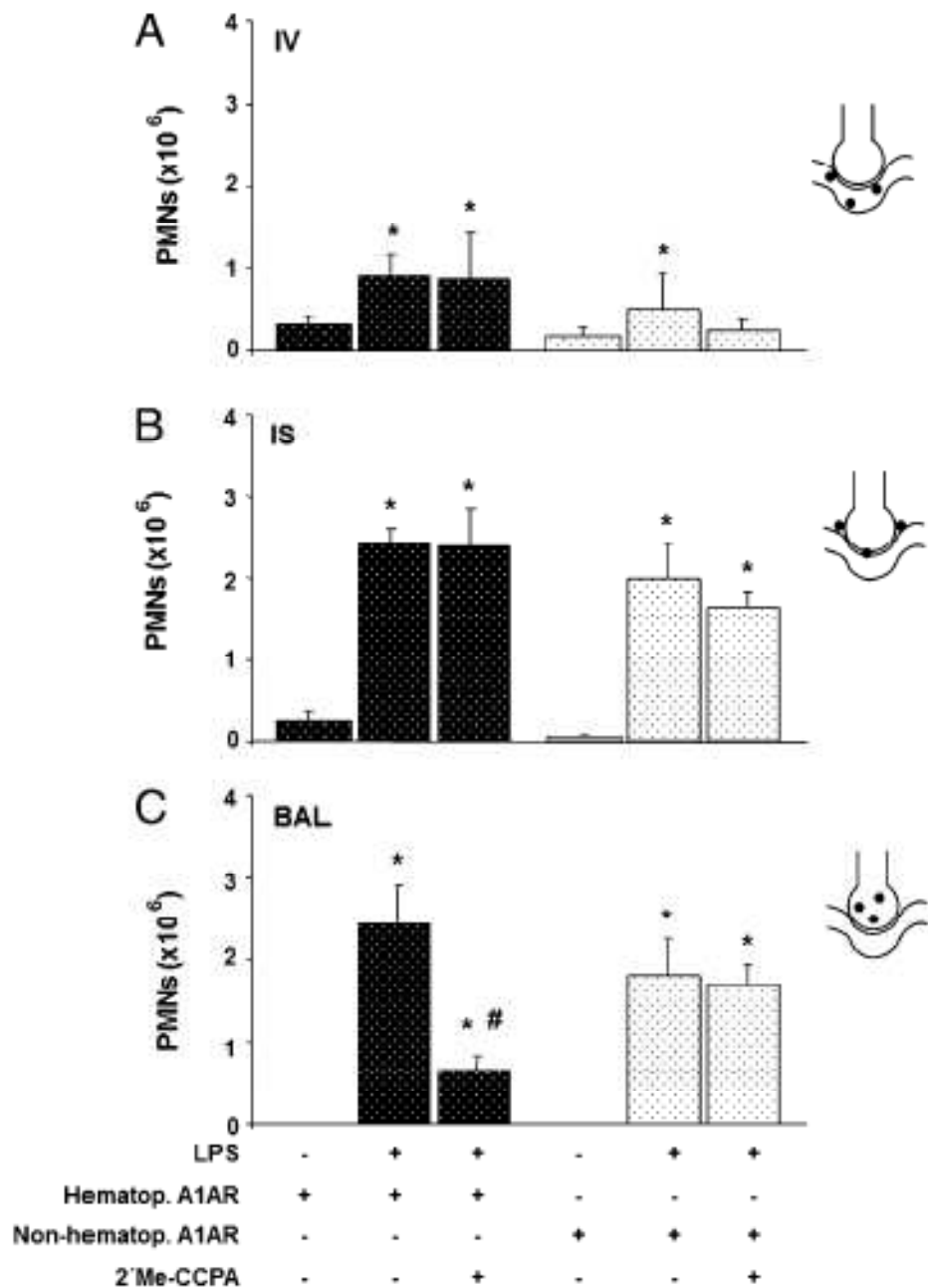


**Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung der A1AR-Expression in Wildtyp- und A1AR<sup>-/-</sup>-Mauslungen**

Mittels A1AR-Antikörper wurden die Lungenpräparate 24 Stunden nach LPS-Exposition gefärbt und dargestellt (A). Die LPS-bedingte A1AR-Expression bei humanen Endothel-(HMVEC-L) und Epithelzellen (A549) wurde mittels Western Blot bestimmt (B). Entnommen aus (33).

Durchflusszytometrisch wurde die PMN Akkumulation in den Lunge von chimären Mäusen untersucht. Die Expression von A1AR in hämatopoetischen oder nicht hämatopoetischen Zellen zeigte keine Effekte bei der LPS-bedingten Ansammlung von PMNs im Intravaskularraum.

Die transendotheliale Migration im Interstitium war bei den Mäusen, welche den A1AR bei nicht hämatopoetische Zellen nicht exprimieren, erhöht ( $2,4 \pm 0,2 \times 10^6$ ). Die transendotheliale Migration bei chimären Mäusen, welche den A1AR bei hämatopoetische Zellen nicht exprimieren, zeigte keinen Unterschied zu den Ergebnissen bei WT-Mäusen. Die Effekte deuten darauf hin, dass der A1AR auf den PMNs für deren Transmigration ins Interstitium verantwortlich sein könnte.

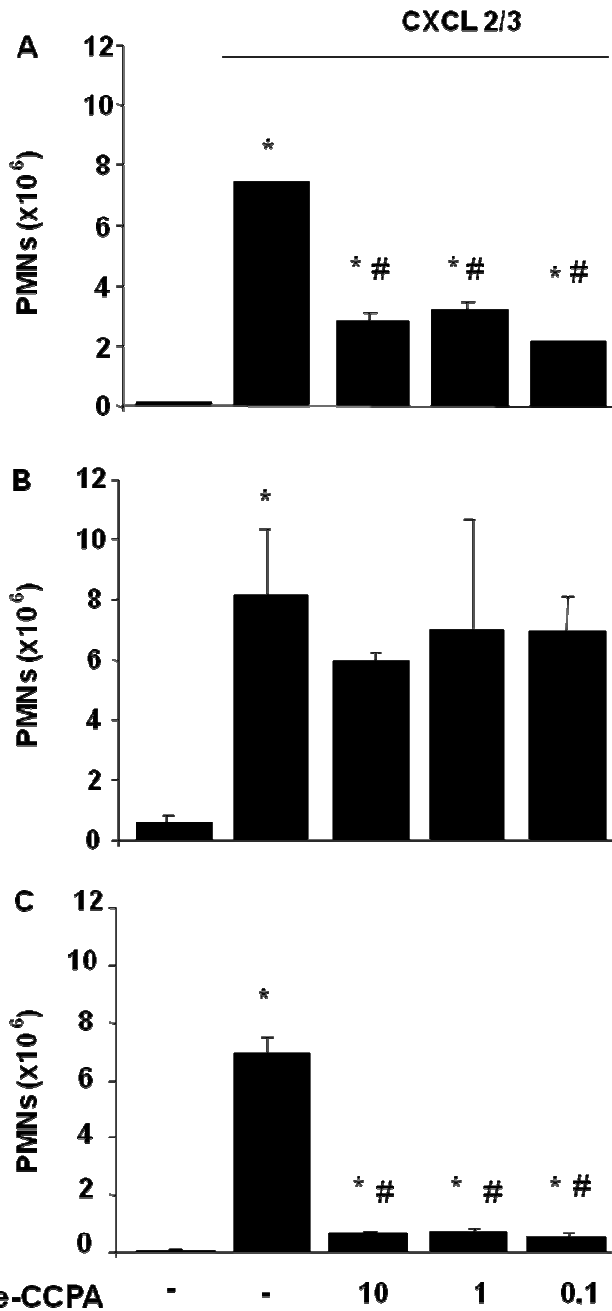


**Abbildung 16: Einfluss von Adenosinrezeptor A1 bei chimären Mäuse**  
 Durchflusszytometrische Bestimmung der PMN-Akkumulation bei chimären Mäusen, welche den A1AR nur in hämatopoetische (schwarze Balken mit weiße Punkte) oder nur in nicht hämatopoetische Zellen (weiße Balken mit schwarze Punkte) exprimieren. Die Anzahl der PMNs wurde in allen 3 Lungenkompartimenten bestimmt ohne oder nach LPS-Inhalation und mit LPS-Inhalation nach Vorbehandlung mit 2' Me-CCPA. Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4 Mäuse). \* p<0,05 versus negativ Gruppe ohne LPS-Inhalation, # p<0,05 versus LPS-exponierte chimäre Mäuse aus der eigene Gruppe ohne 2' Me-CCPA Vorbehandlung. Entnommen aus (33)

#### 4.9 Modulation von A1AR in in vitro-Transmigration humaner PMNs

Für den Transfer unserer bisherigen Ergebnisse in ein humanes Modell der pulmonalen Inflammation haben wir ein in vitro-Transmigrationsassay verwendet. Dabei wurde das Chemokin-bedingte Migrationsverhalten humaner PMNs durch humane Endothel- (HMVEC-L) und Epithelzellen (A549) untersucht. In allen Gruppen resultierte die Chemokin-Stimulation in einer signifikant gesteigerten Migration von PMNs (\*  $p < 0,05$  versus negativ Kontrolle ohne Chemokin).

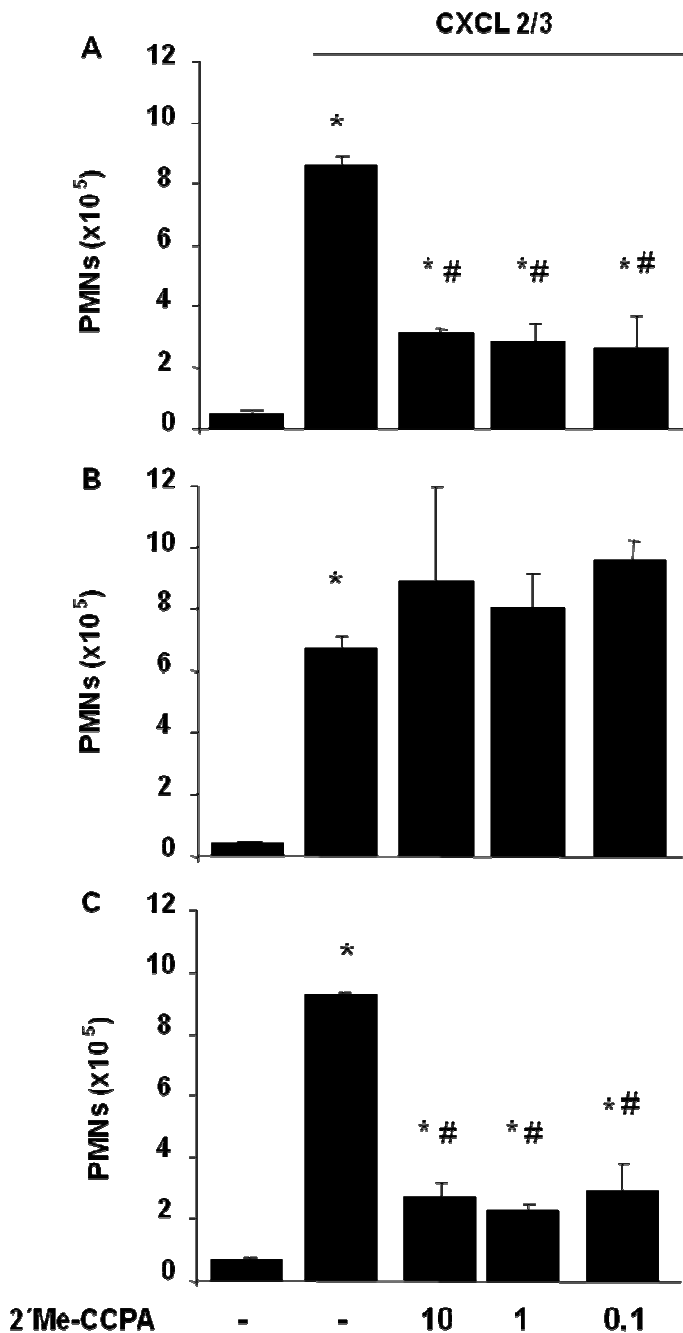
Bei einem Teil der Untersuchungen wurden PMNs, HMVEC-L und A549 Zellen mit den 2´Me-CCPA in verschiedenen Dosierungen (0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml) vorbehandelt. Die A1AR-Modulation der humanen PMNs reduzierte signifikant die Chemokin-bedingte Transmigration durch Endothelzellen (Abbildung 17 A) (10ng/ml:  $28.000 \pm 5.000$  versus  $86.000 \pm 2.000$ , 1ng/ml:  $19.000 \pm 10.000$  versus  $86.000 \pm 2.000$ , 0,1ng/ml:  $19.000 \pm 10.000$  versus  $86.000 \pm 2.000$ ; #  $p < 0,05$ ). Die alleinige Aktivierung von A1AR der Endothelzellen zeigte keine anti-migratorischen Effekte. Die gleichzeitige Behandlung von Endothelzellen und PMNs mit 2´Me-CCPA zeigte keine zusätzlichen Effekte bei der Transmigration (Abbildung 17 C). Ähnliche Effekte konnten wir bei der transepithelialen Migration humaner PMNs beobachten. Die A1AR-Modulation von PMNs mit 2´Me-CCPA reduzierte signifikant die transepitheliale Migration in allen 3 Dosierungen (10ng/ml:  $279.000 \pm 31.000$  versus  $741.000 \pm 5.000$ , 1ng/ml:  $321.000 \pm 22.000$  versus  $741.000 \pm 5.000$ , 01 ng/ml  $212.000 \pm 3.000$  versus  $741.000 \pm 5.000$ , \*  $p < 0,05$ ). Die A1AR-Aktivierung der Epithelzellen zeigte keinen Einfluss auf das migratorische Verhalten der humanen PMNs. Die gleichzeitige A1AR-Aktivierung von humanen PMNs und Epithelzellen zeigte keine additive Effekte bei der transepithelialen Migration (Abbildung 18 A – C).



**Abbildung 17: 2'Me-CCPA reduziert transendotheliale PMN-Migration.**

A1AR-Aktivierung von humanen PMNs reduziert deren Chemokin-induzierte transendotheliale Migration (A). Keine migratorischen Effekte zeigt die alleinige A1 Aktivierung von Endothelzellen (B). Die gleichzeitige Gabe von 2'Me-CCPA zeigt keine additiven Effekte (C). Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardabweichung präsentiert (n = 4 Platten und jeweils Duplikate). \* p<0.05 versus negative Kontrolle ohne CXCL2/3, # p<0.05 versus positive Kontrolle ohne 2'Me-CCPA-Vorbehandlung. Entnommen aus (33).





**Abbildung 18: Inhibition der transepitheliale PMN-Migration durch 2'Me-CCPA.**

Aktivierung humaner PMNs reduziert deren Chemokin-induzierte transepitheliale Migration (A). Keine migratorischen Effekte zeigt die singuläre A1AR-Aktivierung von A549-Epithelzellen (B). Die gleichzeitige Gabe von 2'Me-CCPA zeigt additive Effekte aber ohne statistische Signifikanz (C). Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardabweichung präsentiert (n = 4 Platten und jeweils Duplikate). \* p<0.05 versus negative Kontrolle ohne CXCL2/3, # p<0.05 versus positive Kontrolle ohne 2'Me-CCPA-Vorbehandlung. Entnommen aus (33).

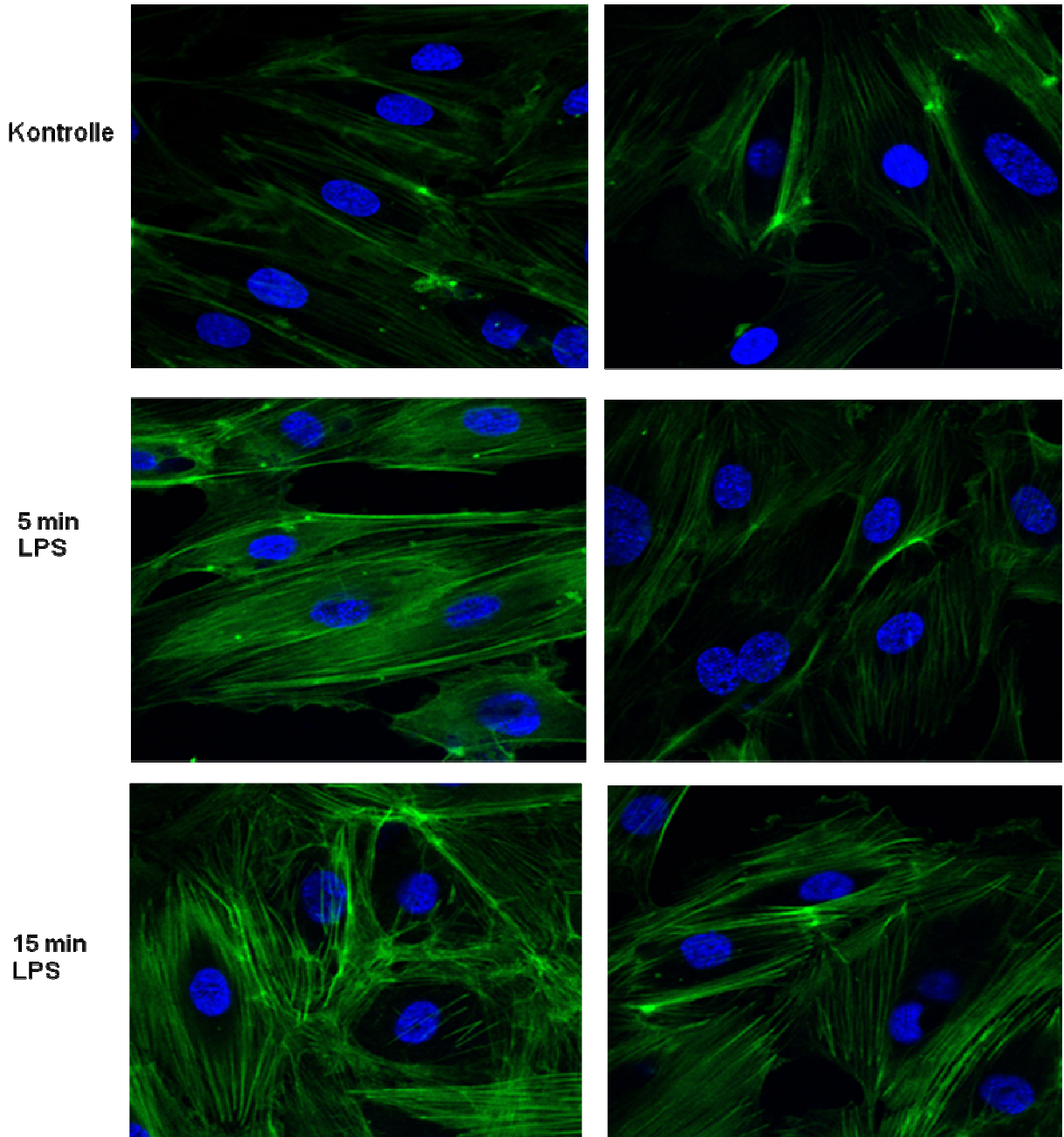
#### **4.10 Pharmakologische Modulation von A1AR-induzierten zytoskelettalen Veränderungen**

Zytoskelettale Veränderungen nach Vorbehandlung mit den 2'Me-CCPA bei Endothel- und Epithelzellen wurden mittels Darstellung von F-Aktin Stressfasern dargestellt. LPS-Exposition induzierte sowohl bei den Endothel- als auch bei den Epithelfasern die Bildung von Stressfasern. Die pharmakologische Modulation mit 2'Me-CCPA (1ng/ml) resultierte in einer reduzierten Ausbildung von Stressfasern bei den humanen Endothelzellen. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Ergebnissen aus der Evans Blue Extravasation und deuten auf eine spezifische Rolle des A1AR bei der Gefäßpermeabilität hin.

Weniger ausgeprägte aber ähnliche Effekte, hatte 2'Me-CCPA bei zytoskelettalem Remodelling von humanen Epithelzellen.

## HMVEC-L

mit 2'Me-CCPA

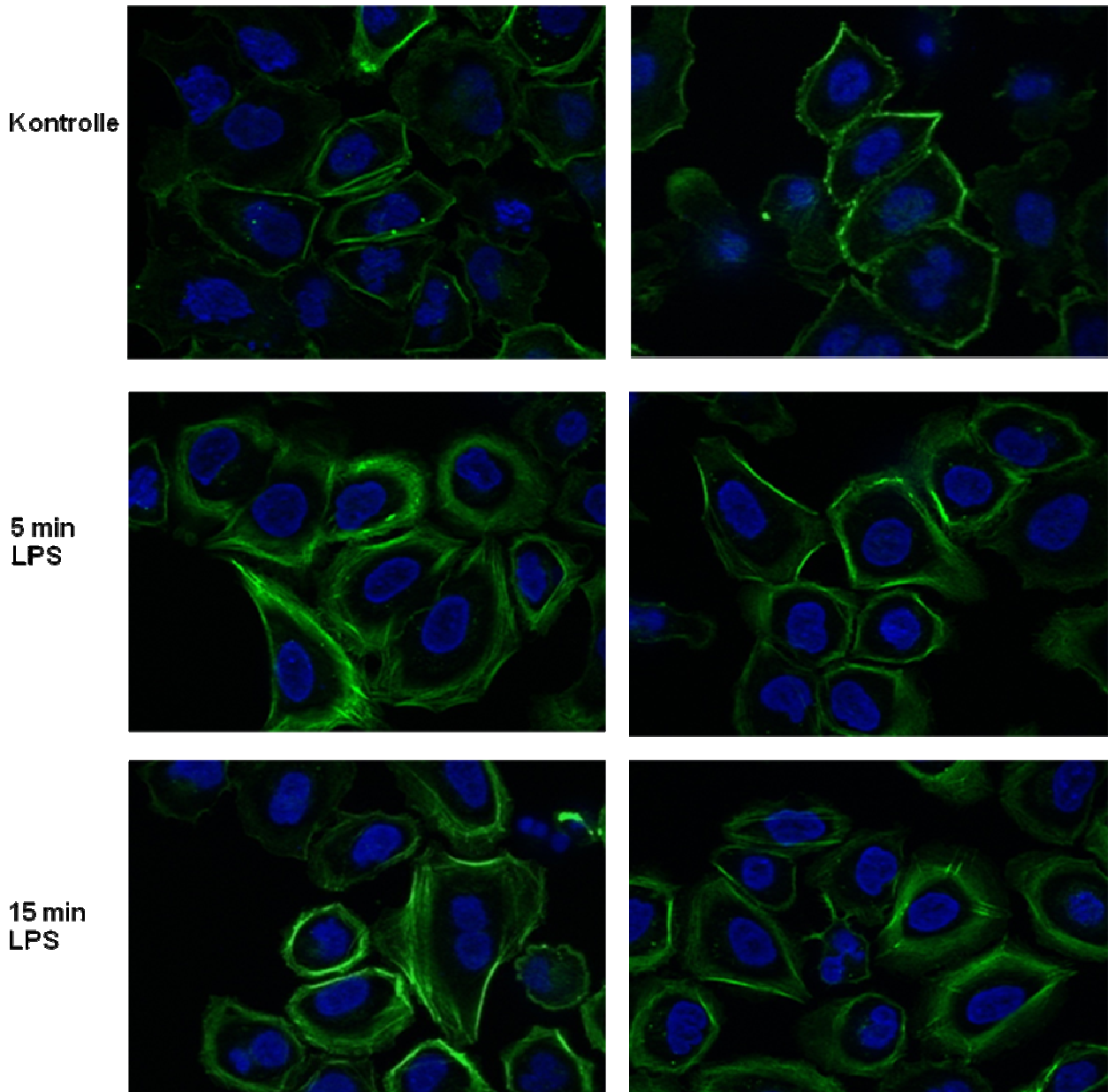


**Abbildung 19: A1AR-Aktivierung reduziert LPS-bedingte F-Aktin Formation bei humanen Endothelzellen (HMVEC-L)**

Die Ausbildung von Stressfasern wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten dargestellt mit oder ohne A1AR-Agonist-Vorbehandlung. Die Abbildungen (63-fache Vergrößerung) sind repräsentativ für drei Versuche mit ähnlichen Ergebnissen. Entnommen aus (33).

A549

mit 2'Me-CCPA

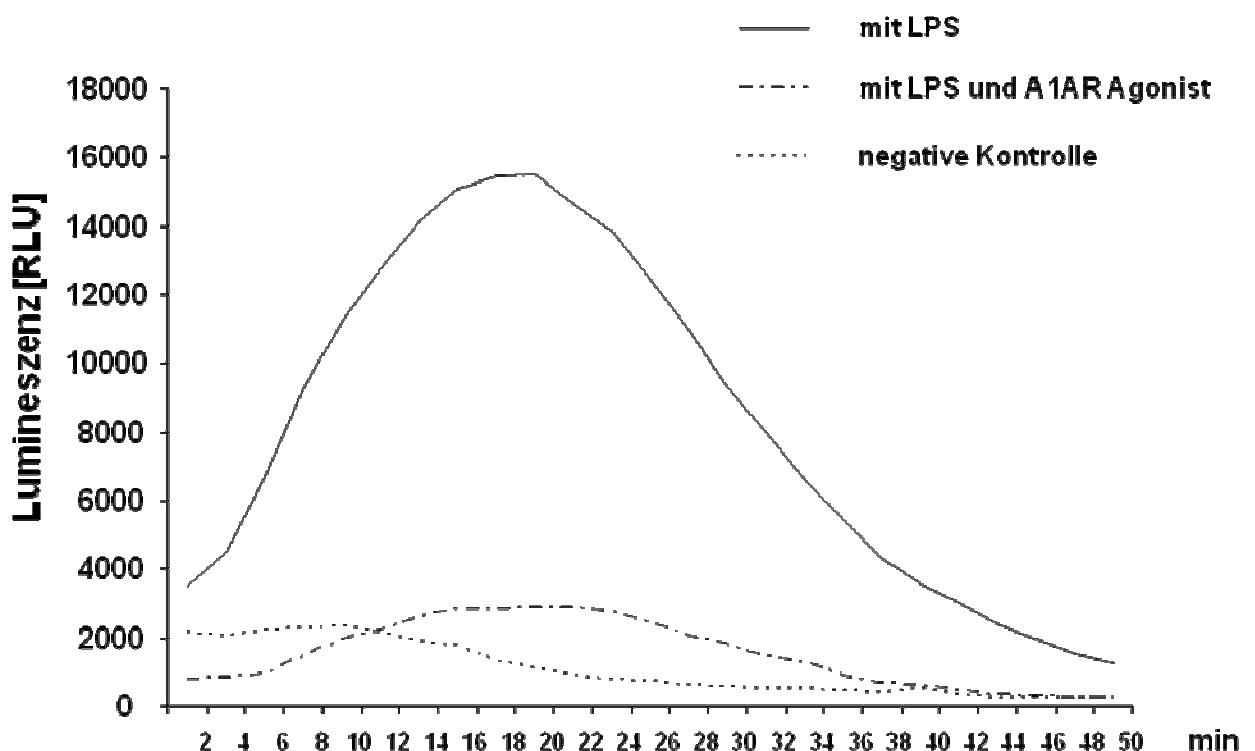


**Abbildung 20: A1AR-Aktivierung reduziert LPS-bedingte F-Aktin Formation bei humanen Epithelzellen (A549).**

Die Ausbildung von Stressfasern wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten dargestellt mit oder ohne A1AR-Agonist Vorbehandlung. Die Abbildungen (63-fache Vergrößerung) sind repräsentativ für drei Versuche mit ähnlichen Ergebnissen. Entnommen aus (33).

#### 4.11 2'-Me-CCPA reduziert die LPS-bedingte Ausbildung von Sauerstoffradikalen humaner PMNs

Für die Zerstörung und Störungen der pulmonalen Architektur im Rahmen des ARDS wird unter anderem auch die unkontrollierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale verantwortlich gemacht. Bei Versuchen zur Bestimmung von „Oxidative Burst“ bei humanen PMNs unter Inflammationsbedingungen, führte die Aktivierung von A1AR zur einer Reduktion der LPS-bedingten Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale.



**Abbildung 21: 2'-Me-CCPA reduziert die LPS-bedingte Bildung von Sauerstoffradikalen.**

Bildung reaktiver Sauerstoffradikale von humanen PMNs mit oder ohne LPS-Exposition und die Effekte einer pharmakologischen Vorbehandlung mit dem 2'-Me-CCPA (1ng/ml). Entnommen aus (33).

## 5 Diskussion

Ziel dieser Studie war die Rolle des Adenosinrezeptors A1 bei der Migration neutrophiler Granulozyten in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation zu untersuchen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Adenosinrezeptor A1 bei der Migration neutrophiler Granulozyten und bei der Regulierung der mikrovaskulären Permeabilität involviert ist. In verschiedenen Versuchen reduzierte ein spezifischer A1AR-Agonist sowohl die LPS-induzierte PMN-Migration als auch die mikrovaskuläre Permeabilität.

Des Weiteren konnten wir bei chimären Mäusen beobachten, dass A1AR über die hämatopoetischen Zellen die transepitheliale Migration reduziert, am ehesten durch Inhibition der Ausschüttung von inflammatorischen Chemokinen. Extrazelluläres Adenosin entsteht durch katalytische Spaltung von Adenosintriphosphat durch die Zellmembran-gebundenen Enzyme Apyrase (CD39, ATP/ADP->AMP) und 5'-Ecto-Nucleotidase (CD73, AMP->Adenosin). Adenosin bindet an einem der vier G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptoren (AR). Es gibt vier Subtypen (A1, A2a, A2b und A3), welche ubiquitär auf der Oberfläche von hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Die Aktivierung des Adenosinrezeptors durch Adenosin resultiert in einer spezifischen Zellantwort durch Aktivierung intrazellulärer Kaskaden.

In Vorarbeiten wurde der Adenosinrezeptor A1 als ein wichtiger Rezeptor bei der Inflammation von verschiedenen Organsystemen identifiziert. Bei den Untersuchungen zu akuter Inflammation an Niere (34-36), Herz (37), Leber (38) und Gehirn (39) konnte man dem A1AR anti-inflammatorische Eigenschaften nachweisen. Des Weiteren wird impliziert, dass die Aktivierung des Adenosinrezeptors A1 intrazelluläre Kaskaden der Expression des A2aAR triggert und dadurch bei anti-inflammatorischen Effekten involviert ist. Kürzlich wurde im Ischämie-Reperfusion-Lungenmodell gezeigt, dass unter anderem die Aktivierung des A1-Adenosinrezeptors zu einer Reduktion der TNF- $\alpha$  und MPO Produktion und somit zur Reduktion des Lungenödems führt (40).

Die Rolle des Adenosinrezeptors A1 für die LPS-induzierte pulmonale Inflammation wurde bisher nicht systematisch untersucht.

Die A1AR-Expression im pulmonalen Gewebe konnte sowohl in Endothel- als auch in Epithelzellen und auch in Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden (25). In einer früheren Arbeit führte die pharmakologische Antagonisierung des A1AR zu einer Reduktion der LPS-bedingten Inflammation und implizierte eine pro-inflammatorische Rolle (26). Zusätzlich resultierte die pharmakologische Modulation des A1AR in früheren in vitro-Untersuchungen in positiven Effekten auf das chemotaktische Verhalten humaner PMNs (41). Eine wichtige Rolle spielte dabei die Intaktheit der Mikrotubuli von PMNs. Diese Effekte konnten wir in unseren in vitro-Untersuchungen nicht feststellen. Aktuelle Studien in murinen Ischämie/Reperfusion- und Endotoxin-induzierten Modellen postulieren protektive Effekte in der pulmonalen Inflammation (27, 28). Der Fokus beider Arbeiten ist die Rolle des A1AR bei der Entstehung des Lungenödems. Dabei war die Rolle des A1AR bei der Migration neutrophiler Granulozyten bisher nicht Gegenstand von Untersuchungen.

Studien zur pulmonalen Inflammation mit Adenosin-Desaminase Knockout-Mäusen gaben erste Andeutungen, dass das Fehlen von A1AR mit einer gesteigerten pulmonalen Inflammation und Destruktion des pulmonalen Gewebes einhergeht (25). Im Rahmen dieser Arbeit wurden erhöhte Freisetzungen von inflammatorischen Chemokinen beobachtet, welche mit unseren Daten übereinstimmen.

Die Endotoxin-bedingte Freisetzung inflammatorischer Chemokine durch Alveolarmakrophagen und Epithelgewebe spielen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (4). Untersuchungen an den Adenosinrezeptoren A2a und A2b zeigten, dass die pharmakologische Modulation von Adenosinrezeptoren die Freisetzung von inflammatorischen Chemokinen reduziert und somit auch die Migration neutrophiler Granulozyten beziehungsweise die pulmonale Inflammation signifikant reduziert (19, 20, 30).

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die pharmakologische Aktivierung von A1AR mit dem spezifischen A1AR-Agonist 2'-Me-CCPA die Freisetzung von

CXCL2/3, IL-6 und TNF- $\alpha$  signifikant hemmt (Abbildung 12) und reihen sich somit in die oben genannten Vorarbeiten.

Die unkontrollierte Migration aktivierter PMNs und die Ausbildung des Lungenödems sind 2 wichtige Merkmale des ARDS. Vorstudien haben aber gezeigt, dass diese auch unabhängig voneinander ablaufen können (42).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte A1AR-mRNA und Proteinexpression hauptsächlich auf die hämatopoetischen Zellen zurückzuführen ist (Abbildung 7). Des Weiteren konnte bei den chimären Mäusen gezeigt werden, dass die A1AR-Aktivierung die PMN-Migration reduzierte, wenn der A1AR bei den hämatopoetischen Zellen exprimiert wurde (Abbildung 15).

Zusätzlich zeigte das Migrationsverhalten bei chimären Mäusen auch, dass die transendotheliale PMN-Migration auch von A1AR der Endothelzellen abhängig ist.

Die Störung der mikrovaskulären Permeabilität zeigte sich deutlich erhöht bei den A1-gendefizienten Mäusen und es konnte auch gezeigt werden, dass es im zeitlichen Verlauf zu signifikant proteinreicherer bronchoalveolärer Flüssigkeit kam. Während die Aktivierung von A1AR bei WT-Mäusen proteinreiches Exsudat signifikant reduzierte und somit Störungen der mikrovaskulären Permeabilität eingrenzte.

Bisherige Untersuchungen zu Adenosinrezeptoren in der pulmonalen Inflammation haben sich hauptsächlich auf die Adenosinrezeptoren A2a und A2b fokussiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Aktivierung von A2a zu anti-inflammatorischen Effekten durch Modulation an der Migration von PMNs führte (19). Eine anti-inflammatorische Rolle des Adenosinrezeptor A2b in der pulmonalen Inflammation konnte gezeigt werden, welche hauptsächlich auf Effekte an Endothel- und Epithelzellen zurückzuführen ist (20, 30).

Adenosinrezeptoren A2a und A2b induzieren intrazelluläre Kaskaden über eine Erhöhung des intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP), welches für die weitere Aktivierung von intrazellulären Kaskaden zuständig ist.



Die Aktivierung von Adenosinrezeptor A1 induziert die Reduktion von intrazellulärem cAMP.

Interessanterweise resultiert die Aktivierung von Adenosinrezeptoren A1 und A2a in anti-inflammatorische Effekte bei der pulmonalen Inflammation, obwohl beide gegensätzliche Effekte auf die intrazellulären cAMP-Konzentration haben. Ein cAMP-unabhängiger Signalweg, der vor allem eine A1AR, aber nicht A2a-vermittelte Aktivierung von Phospholipase C beinhaltet, ist eine mögliche Hypothese für dieses Phänomen (23, 43).

Zusammenfassend, identifizieren unsere Untersuchungen den Adenosinrezeptor A1 als einen wichtigen Mediator in der LPS-bedingten pulmonalen Inflammation. Die Aktivierung von A1AR reduzierte dosisabhängig die Migration von PMNs im Alveolarraum. Des Weiteren führte die Modulation von A1AR zur Reduktion der LPS-bedingten mikrovaskulären Hyperpermeabilität durch Verbesserung der endothelialen Integrität. Die pharmakologische Modulation des Adenosinrezeptors A1 erscheint somit als ein möglicher therapeutischer Ansatz bei der LPS-bedingten pulmonalen Inflammation.

## 6 Zusammenfassung

Die frühe Phase der akuten respiratorischen Insuffizienz im Rahmen des Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) ist gekennzeichnet durch eine exzessive Rekrutierung und unkontrollierte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (PMNs). Die pharmakologische Modulation der PMN-Migration führte in vielen experimentellen ARDS-Modellen zu einer deutlichen Verbesserung des Krankheitsverlaufs sowie zur Reduktion der Mortalität. Studien haben gezeigt, dass extrazelluläres Adenosin über vier verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (A1, A2a, A2b, A3) sowohl wichtige pro- als auch anti-inflammatorische Effekte triggert. Der Beitrag der einzelnen Adenosin Rezeptoren ist bisher noch unzureichend untersucht. Ziel unserer Studien war, die Bedeutung des Adenosins und des A1-Adenosinrezeptoren bei den wichtigsten Aspekten einer transienten pulmonalen Inflammation zu untersuchen. Wir untersuchten deren Einfluss auf die Migration neutrophiler Granulozyten, auf die mikrovaskuläre Permeabilität und auf die Ausschüttung wichtiger inflammatorischer Zytokinen.

### Methoden

Nach Genehmigung durch die örtliche Tierschutz-Kommission untersuchten wir in einem murinen ARDS-Modell die Bedeutung des Adenosinrezeptors A1. In einer speziellen Kammer ließen wir Mäuse (C57/Bl6) Lipopolysaccharide (LPS) inhalieren und induzierten damit eine pulmonale Inflammation mit Migration von PMNs, die Ausbildung eines Lungenödems und die Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren. Für unsere in vivo Versuche nutzten wir Wildtyp- (WT, C57/Bl6) und A1-gendefiziente Mäuse (A1AR<sup>-/-</sup>). Wir haben auch chimäre Mäuse generiert, welche A1AR entweder auf hämatopoetischen oder auf nicht hämatopoetischen Zellen exprimierten. Die LPS-induzierte mRNA- und Rezeptoren-Expression von A1-Adenosinrezeptoren in murinen Lungen wurden mittels reverser Polymerase Chain Reaction (PCR) untersucht. Die Effekte von A1AR wurden auch in chimären Mäusen untersucht. Dabei verwendeten wir ein durchflusszytometrisches Verfahren zum Nachweis von PMNs in den

verschiedenen Kompartimenten der Lunge (Intravaskularraum, Interstitium, Alveolarraum). Darüber hinaus testeten wir die Effekte der Vorbehandlung mit einem spezifischen Agonisten des A1-Adenosinrezeptors. Der Einfluss A1AR auf die mikrovaskuläre Permeabilität wurde mittels Evans Blue-Extravasation bestimmt. Bei unseren Untersuchungen wurde zusätzlich die LPS-induzierte Freisetzung relevanter chemotaktischer Zytokine in der bronchoalveolären Flüssigkeit bestimmt. Die Effekte der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation und die Rolle des Adenosins und Adenosinrezeptors A1 haben wir außerdem immunhistochemisch untersucht. Zusätzlich haben wir die Rolle des A1-Adenosinrezeptors bei der Bildung von LPS-induzierten Stressfasern *in vitro* untersucht.

## Ergebnisse

Die LPS-induzierte pulmonale Inflammation führte zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression von A1AR. Die Inhalation von LPS resultierte in Wildtyp-Mäusen (WT) in einer signifikanten Migration von PMNs in den Lungenkompartimenten in allen drei Studien. Bei A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte eine signifikant erhöhte PMN-Akkumulation im Alveolarraum und Interstitium beobachtet werden. Die pharmakologische Aktivierung von A1 führte in WT-Mäusen sowie in chimären Mäusen zu einer Abnahme der PMNs im Interstitium und Alveolarraum. Interessanterweise führte die pharmakologische Aktivierung mit dem A1-Agonisten nur bei chimären Mäusen, die A1AR nur auf hämatopoetischen Zellen exprimierten, zu einer deutlichen Reduktion der PMN-Akkumulation in der BAL. Die LPS-induzierte mikrovaskuläre Permeabilität war in gendefizienten Mäusen ebenfalls signifikant gesteigert. Die pharmakologische Aktivierung von A1AR führte in Wildtyp-Mäusen ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität. Die Vorbehandlung mit dem A1-Agonisten führte zur signifikanten Reduktion der Freisetzung relevanter chemotaktischer Zytokine in den Alveolarraum. Die LPS-induzierte Zerstörung der pulmonalen Architektur und PMN-Infiltration als mikroskopischer Nachweis des ARDS konnte auch in unseren Untersuchungen festgestellt werden. Bei A1AR<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte eine deutlichere PMN-

Infiltration und Zerstörung der Lungenarchitektur dargestellt werden. In vitro führte die Aktivierung des A1-Adenosinrezeptors sowohl in humanen Endothel- (HMVEC-L) als auch in humanen Epithelzellen (A549) zu einer reduzierten Ausbildung von F-Aktin Stressfasern.

#### Zusammenfassung

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Adenosinrezeptor A1 eine kritische Rolle in der LPS-bedingten pulmonalen Inflammation spielt. Die pharmakologische Modulation von A1AR reduzierte die Infiltration von PMNs und reduzierte die LPS-bedingten Hyperpermeabilität des pulmonalen Gewebes. Diese Effekte könnten einen möglichen pharmakologischen Ansatz für zukünftige Therapien des ARDS darstellen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. **Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD.** 2005. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* **353**:1685-1693.
2. **Ware LB, Matthay MA.** 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **342**:1334-1349.
3. **Martin TR.** 2002. Neutrophils and lung injury: getting it right. *J Clin Invest* **110**:1603-1605.
4. **Reutershan J, Morris MA, Burcin TL, Smith DF, Chang D, Saprito MS, Ley K.** 2006. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest* **116**:695-702.
5. 2000. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* **342**:1301-1308.
6. **Taccone P, Pesenti A, Latini R, Polli F, Vagginelli F, Mietto C, Caspani L, Raimondi F, Bordone G, Iapichino G, Mancebo J, Guerin C, Ayzac L, Blanch L, Fumagalli R, Tognoni G, Gattinoni L.** 2009. Prone positioning in patients with moderate and severe acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* **302**:1977-1984.
7. **Zhang H, Downey GP, Suter PM, Slutsky AS, Ranieri VM.** 2002. Conventional mechanical ventilation is associated with bronchoalveolar lavage-induced activation of polymorphonuclear leukocytes: a possible mechanism to explain the systemic consequences of ventilator-induced lung injury in patients with ARDS. *Anesthesiology* **97**:1426-1433.
8. **Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J.** 2000. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**:L1137-1145.
9. **Reutershan J, Basit A, Galkina EV, Ley K.** 2005. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**:L807-815.
10. **Azoulay E, Attalah H, Yang K, Jouault H, Schlemmer B, Brun-Buisson C, Brochard L, Harf A, Delclaux C.** 2002. Exacerbation by granulocyte colony-stimulating factor of prior acute lung injury: implication of neutrophils. *Crit Care Med* **30**:2115-2122.
11. **Baughman RP, Gunther KL, Rashkin MC, Keeton DA, Pattishall EN.** 1996. Changes in the inflammatory response of the lung during acute respiratory distress syndrome: prognostic indicators. *Am J Respir Crit Care Med* **154**:76-81.
12. **Hasko G, Cronstein BN.** 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* **25**:33-39.
13. **Fredholm BB.** 2007. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* **14**:1315-1323.
14. **Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri KC, Eltzschig HK.** 2009. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical

- mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB J* **23**:473-482.
15. **Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjoji K, Robson SC, Colgan SP.** 2003. Coordinated adenosine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med* **198**:783-796.
  16. **Eltzschig HK, Thompson LF, Karhausen J, Cotta RJ, Ibla JC, Robson SC, Colgan SP.** 2004. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood* **104**:3986-3992.
  17. **Eckle T, Fullbier L, Wehrmann M, Khoury J, Mittelbronn M, Ibla J, Rosenberger P, Eltzschig HK.** 2007. Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury. *J Immunol* **178**:8127-8137.
  18. **Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J.** 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **53**:527-552.
  19. **Reutershan J, Cagnina RE, Chang D, Linden J, Ley K.** 2007. Therapeutic anti-inflammatory effects of myeloid cell adenosine receptor A2a stimulation in lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol* **179**:1254-1263.
  20. **Schingnitz U, Hartmann K, Macmanus CF, Eckle T, Zug S, Colgan SP, Eltzschig HK.** 2010. Signaling through the A2B adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury. *J Immunol* **184**:5271-5279.
  21. **Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W.** 2000. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**:364-374.
  22. **Schepp CP, Reutershan J.** 2008. Bench-to-bedside review: adenosine receptors--promising targets in acute lung injury? *Crit Care* **12**:226.
  23. **Dickenson JM, Hill SJ.** 1998. Involvement of G-protein betagamma subunits in coupling the adenosine A1 receptor to phospholipase C in transfected CHO cells. *Eur J Pharmacol* **355**:85-93.
  24. **Figler RA, Lindorfer MA, Graber SG, Garrison JC, Linden J.** 1997. Reconstitution of bovine A1 adenosine receptors and G proteins in phospholipid vesicles: betagamma-subunit composition influences guanine nucleotide exchange and agonist binding. *Biochemistry* **36**:16288-16299.
  25. **Sun CX, Young HW, Molina JG, Volmer JB, Schnermann J, Blackburn MR.** 2005. A protective role for the A1 adenosine receptor in adenosine-dependent pulmonary injury. *J Clin Invest* **115**:35-43.
  26. **Neely CF, Jin J, Keith IM.** 1997. A1-adenosine receptor antagonists block endotoxin-induced lung injury. *Am J Physiol* **272**:L353-361.
  27. **Yildiz G, Demiryurek AT, Gumusel B, Lippton H.** 2007. Ischemic preconditioning modulates ischemia-reperfusion injury in the rat lung: role of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol* **556**:144-150.

28. **Heller AR, Rothermel J, Weigand MA, Plaschke K, Schmeck J, Wendel M, Bardenheuer HJ, Koch T.** 2007. Adenosine A1 and A2 receptor agonists reduce endotoxin-induced cellular energy depletion and oedema formation in the lung. *Eur J Anaesthesiol* **24**:258-266.
29. **Haselton FR, Alexander JS, Mueller SN.** 1993. Adenosine decreases permeability of in vitro endothelial monolayers. *J Appl Physiol* **74**:1581-1590.
30. **Eckle T, Grenz A, Laucher S, Eltzschig HK.** 2008. A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. *J Clin Invest* **118**:3301-3315.
31. **Moitra J, Sammani S, Garcia JG.** 2007. Re-evaluation of Evans Blue dye as a marker of albumin clearance in murine models of acute lung injury. *Transl Res* **150**:253-265.
32. **Patterson CE, Rhoades RA, Garcia JG.** 1992. Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. *J Appl Physiol* **72**:865-873.
33. **Ngamsri KC, Wagner R, Vollmer I, Stark S, Reutershan J.** 2010. Adenosine receptor A1 regulates polymorphonuclear cell trafficking and microvascular permeability in lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol* **185**:4374-4384.
34. **Lee HT, Gallos G, Nasr SH, Emala CW.** 2004. A1 adenosine receptor activation inhibits inflammation, necrosis, and apoptosis after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* **15**:102-111.
35. **Lee HT, Xu H, Nasr SH, Schnermann J, Emala CW.** 2004. A1 adenosine receptor knockout mice exhibit increased renal injury following ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**:F298-306.
36. **Joo JD, Kim M, Horst P, Kim J, D'Agati VD, Emala CW, Sr., Lee HT.** 2007. Acute and delayed renal protection against renal ischemia and reperfusion injury with A1 adenosine receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**:F1847-1857.
37. **Liao Y, Takashima S, Asano Y, Asakura M, Ogai A, Shintani Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M.** 2003. Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. *Circ Res* **93**:759-766.
38. **Kim J, Kim M, Song JH, Lee HT.** 2008. Endogenous A1 adenosine receptors protect against hepatic ischemia reperfusion injury in mice. *Liver Transpl* **14**:845-854.
39. **Tsutsui S, Schnermann J, Noorbakhsh F, Henry S, Yong VW, Winston BW, Warren K, Power C.** 2004. A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. *J Neurosci* **24**:1521-1529.
40. **Gazoni LM, Walters DM, Unger EB, Linden J, Kron IL, Laubach VE.** 2010. Activation of A1, A2A, or A3 adenosine receptors attenuates lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* **140**:440-446.
41. **Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M.** 1990. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils

possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O<sub>2</sub> generation, respectively. *J Clin Invest* **85**:1150-1157.

42. **Gao X, Xu N, Sekosan M, Mehta D, Ma SY, Rahman A, Malik AB.** 2001. Differential role of CD18 integrins in mediating lung neutrophil sequestration and increased microvascular permeability induced by *Escherichia coli* in mice. *J Immunol* **167**:2895-2901.
43. **Schulte G, Fredholm BB.** 2003. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* **15**:813-827.



## 8 Veröffentlichungen

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde bereits in folgender Publikationsschrift veröffentlicht:

**Ngamsri KC**, Wagner R, Vollmer I, Stark S, Reutershan J.

**Adenosine receptor A1 regulates polymorphonuclear cell trafficking and microvascular permeability in lipopolysaccharide-induced lung injury.**

J Immunol. 2010 Oct 1;185(7):4374-84.

## 9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reutershan für die Überlassung der Arbeit und die Möglichkeit eigene Ideen und Fragestellungen zu verwirklichen. Seine unermessliche Geduld, seine Anregungen und konstruktiven Ratschlägen habe ich sehr geschätzt.

Des Weiteren möchte ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit selbst zu veröffentlichen und auch auf verschiedenen Kongressen vortragen zu dürfen, sehr bedanken.

Großer Dank gilt Rosalyn Wagner für die gemeinsamen Wochenenden im Labor und für die nötige Motivation bei Misserfolgen. Eine bessere Labormitstreiterin hätte ich mir nicht wünschen können.

Des Weiteren danke ich besonders Irene Vollmer und Stefanie Stark für die tolle Unterstützung im Labor und die große Hilfsbereitschaft bei labortechnischen Fragen. Ebenfalls sei auch allen anderen Mitarbeitern der anästhesiologischen Forschungsgruppen in Derendingen für die tolle Atmosphäre gedankt.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für die ständige Unterstützung, den unerschütterlichen Glauben an mich und weil es sie einfach gibt.

Mein größter Dank geht an meine Frau Helga, welche die langen Zeiten und vielen Wochenenden im Labor toleriert hat. Ihre konstruktive Kritik und Ratschläge haben erst vieles ermöglicht. Von Herzen Danke!

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Kristian-Christos Ngamsri

Geboren am 14.10.1980 in Köln

### Schulausbildung

1986 -1992	Grundschule, Feres, Griechenland
1992 – 1995	Gymnasium, Feres, Griechenland
1995 – 1998	Lyzeum, Tübingen
20.05.1998	Abitur, Tübingen
2000	Hochschulzugangsberechtigung

### Ausbildung

2000 – 2003	Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger, Universitätsklinikum Tübingen
-------------	---

### Studium Humanmedizin

2004 – 2005	Phillips-Universität Marburg
2005 – 2010	Eberhard Karls Universität Tübingen
20.09.2006	1. Staatsexamen
30.11.2010	2. Staatsexamen
09.12.2010	Approbation

Seit 15.12.2010	Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen
-----------------	--