

# **Anti-inflammatorische Eigenschaften von Makrolid-Antibiotika bei akuter Lipopolysaccharid-induzierter Entzündung**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie –  
der Universität Regensburg



vorgelegt von  
Kristina Lotter  
aus Schnaittenbach

2006

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 2002 bis Februar 2006 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Kees am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 13.02.2006

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2006

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. R. Seifert	(Vorsitzender)
Prof. Dr. F. Kees	(Erstgutachter)
Prof. Dr. A. Kurtz	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. J. Heilmann	(Drittprüfer)

**Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 DIE AKUTE ENTZÜNDUNG .....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Überblick über das Immunsystem .....	9
1.1.2 Das angeborene Immunsystem .....	10
1.1.2.1 Zellen der angeborenen Immunantwort .....	10
1.1.2.2 Immunmodulatoren der angeborenen Immunantwort .....	11
1.1.2.3 Erkennungssysteme der angeborenen Immunantwort .....	16
1.1.3 Toll-like Rezeptor-4 vermittelte Immunantwort .....	16
1.1.3.1 Toll-like Rezeptoren und Lipopolysaccharid .....	16
1.1.3.2 Erkennung von LPS durch TLR-4 .....	17
1.1.3.3 Signaltransduktionswege des TLR-4 .....	18
1.1.3.4 Mitogenaktivierte Proteinkinasen .....	20
<b>1.2 MAKROLID-ANTIBIOTIKA .....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Struktur der Makrolide .....	22
1.2.2 Wirkmechanismus und Wirkspektrum der Makrolide .....	23
1.2.3 Pharmakokinetische Eigenschaften der Makrolide .....	25
<b>1.3 DIFFUSE PANBRONCHIOLITIS .....</b>	<b>27</b>
1.3.1 Klinische Symptome, Epidemiologie und Ursachen der diffusen Panbronchiolitis .....	27
1.3.2 Einsatz von Makrolid-Antibiotika in der Therapie der diffusen Panbronchiolitis .....	28
<b>2 FRAGESTELLUNGEN .....</b>	<b>30</b>
<b>3 MATERIAL .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND PHARMAKA .....</b>	<b>31</b>
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	31
3.1.2 Pharmaka und Testsubstanzen .....	33
<b>3.2 VERBRAUCHSMATERIAL .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 GERÄTE .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4 KITS FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGIE UND PROTEINBIOCHEMIE .....</b>	<b>35</b>
<b>3.5 MOLEKULARGEWICHTSSTANDARDS .....</b>	<b>36</b>
<b>3.6 ANTIKÖRPER UND ENZYME .....</b>	<b>36</b>
3.6.1 Antikörper .....	36
3.6.2 Enzyme .....	37

---

<b>3.7 OLIGONUKLEOTIDE UND VEKTOREN .....</b>	<b>37</b>
3.7.1 Oligonukleotide .....	37
3.7.1.1 Reverse Transkription .....	37
3.7.1.2 Primer für die IL-1 $\beta$ -Promotor-Konstrukte .....	37
3.7.1.3 Primer für die quantitative PCR .....	38
3.7.2 Vektoren .....	38
<b>3.8 PUFFER, MEDIEN UND ZUBEREITUNGEN.....</b>	<b>39</b>
3.8.1 Puffer und Medien.....	39
3.8.2 Zubereitungen der Testsubstanzen zur Applikation in vivo.....	41
3.8.3 Lösungen der Testsubstanzen für die Zellversuche.....	41
<b>3.9 BAKTERIEN UND ZELLINNEN.....</b>	<b>42</b>
<b>3.10 VERSUCHSTIERE .....</b>	<b>42</b>
<b>4 METHODEN .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 TIERE.....</b>	<b>43</b>
4.1.1 Tierhaltung .....	43
4.1.2 Induktion einer akuten systemischen Entzündungsreaktion durch intraperitoneale Applikation von Lipopolysaccharid .....	43
4.1.3 Modell einer akuten Lungenentzündung durch nasale Applikation von Lipopolysaccharid .....	44
<b>4.2 BAKTERIENKULTUR .....</b>	<b>45</b>
4.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	45
4.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> .....	45
<b>4.3 ARBEITEN MIT ZELLKULTUREN .....</b>	<b>45</b>
4.3.1 Zellkulturbedingungen .....	45
4.3.2 Stimulation der Zellen mit LPS .....	46
4.3.3 Transfektion.....	46
4.3.3.1 Transfektion mit ExGen 500 .....	47
4.3.3.2 Transfektion mit Fugene 6.....	47
4.3.3.3 Transfektion mittels Elektroporation.....	47
4.3.3.4 Transfektion mittels Magnetofektion .....	48
4.3.4 Reportergen-Assay .....	49
<b>4.4 ARBEITEN MIT RNA .....</b>	<b>49</b>
4.4.1 Vorkehrungen bei Arbeiten mit RNA .....	49
4.4.2 Isolierung der Gesamt-RNA .....	49
4.4.3 Bestimmung der RNA-Konzentration .....	50
4.4.4 Reverse Transkription .....	51
<b>4.5 ARBEITEN MIT DNA .....</b>	<b>51</b>
4.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	51
4.5.1.1 Mini Prep .....	51
4.5.1.2 Maxi Prep .....	52
4.5.2 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	52
4.5.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	53

---

4.5.4	Elution von DNA aus Agarosegelen .....	53
4.5.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	54
4.5.5.1	PCR zur Klonierung der IL-1 $\beta$ -Promotor-Konstrukte .....	54
4.5.5.2	Realtime-PCR mit dem LightCycler-System von Roche .....	54
4.5.6	DNA-Modifikationen .....	55
4.5.6.1	Klonierung von PCR-Produkten in einen TOPO® Vektor .....	55
4.5.6.2	Restriktionsverdau .....	55
4.5.6.3	Dephosphorylierung .....	55
4.5.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten .....	56
4.5.7	DNA-Sequenzanalyse .....	56
<b>4.6</b>	<b>ARBEITEN MIT PROTEINEN.....</b>	<b>56</b>
4.6.1	Isolierung von Proteinen.....	56
4.6.1.1	Gesamtproteinextrakt aus Zellkulturen und Geweben .....	56
4.6.1.2	Isolierung von Phosphoproteinen .....	57
4.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	57
4.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	58
4.6.4	Western Blot .....	58
4.6.5	Detektion membrangebundener Proteine durch Immunfärbung .....	59
4.6.6	Nachweis löslicher Proteine mit dem Enzym-Immunassay .....	60
4.6.7	Kolorimetrische Bestimmung von Stickstoffmonoxid .....	61
<b>4.7</b>	<b>STATISTIK.....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>MODELL EINER AKUTEN LUNGENENTZÜNDUNG.....</b>	<b>62</b>
5.1.1	Einfluss einer nasalen LPS-Applikation auf die Bildung von Entzündungsmediatoren in der Lunge .....	62
5.1.1.1	mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in der Lunge .....	62
5.1.1.2	Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in Lunge und Plasma .....	63
5.1.1.3	mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II in der Lunge .....	64
5.1.2	Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die Induktion von Zytokinen nach nasaler LPS-Gabe .....	65
5.1.2.1	Einfluss auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in der Lunge .....	65
5.1.2.2	Einfluss auf die LPS-induzierte Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in der Lunge .....	66
<b>5.2</b>	<b>MODELL EINER AKUTEN SYSTEMISCHEN ENTZÜNDUNG .....</b>	<b>68</b>
5.2.1	Einfluss einer intraperitonealen LPS-Applikation auf die Bildung von Entzündungsmediatoren in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz .....	68
5.2.1.1	mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in Lunge, Leber, Herz Niere und Milz .....	68
5.2.1.2	Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in Lunge, Leber und Plasma .....	69
5.2.1.3	mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz .....	70
5.2.1.4	Bildung von Prostaglandinen und Entstehung von Stickstoffmonoxid in Lunge, Leber und Plasma .....	71

---

5.2.2 Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die Induktion von Entzündungsmediatoren nach intraperitonealer LPS-Gabe.....	72
5.2.2.1 Einfluss auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz.....	72
5.2.2.2 Einfluss auf die LPS-induzierte Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in Lunge, Leber und Plasma.....	77
5.2.2.3 Einfluss auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz .....	80
5.2.2.4 Einfluss auf die LPS-induzierte Proteinexpression von COX-2 und NOS-II in Lunge und Leber .....	85
5.2.2.5 Einfluss auf die LPS-induzierte Bildung von Prostanoiden und die Entstehung von Stickstoffmonoxid in Lunge, Leber und Plasma .....	86
<b>5.3 ENTZÜNDUNGSREAKTION IN MURINEN MAKROPHAGEN.....</b>	<b>89</b>
5.3.1 Einfluss einer Inkubation mit LPS auf die Bildung von Zytokinen .....	89
5.3.1.1 mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und IL-6 .....	89
5.3.1.2 Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$ .....	90
5.3.2 Einfluss von Makroliden und des Ketolids Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von Zytokinen.....	91
5.3.2.1 Einfluss auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und IL-6.....	91
5.3.2.2 Einfluss auf die LPS-induzierte Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$ .....	92
5.3.2.3 Einfluss auf die LPS-induzierte Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und IL-6 .....	92
5.3.2.4 Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ .....	95
5.3.2.5 Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die LPS-induzierte Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$ .....	96
5.3.2.6 Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die LPS-induzierte Bildung von IL-1 $\beta$ .....	97
5.3.3 Bedeutung der MAP-Kinase-Signaltransduktionswege bei der LPS-induzierten Expression der IL-1 $\beta$ mRNA .....	99
5.3.3.1 Einfluss einer Inkubation mit LPS auf die Aktivierung von MAP-Kinasen .....	99
5.3.3.2 Einfluss selektiver Inhibitoren der MAP-Kinasen auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ .....	100
5.3.3.3 Konzentrations-Wirkungsbeziehung der MAPK-Inhibitoren SB 203580 und SP 600125 für die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ .....	101
5.3.4 Einfluss von Makroliden und des Ketolids Telithromycin auf die LPS-induzierte Aktivierung der p38 MAPK und SAPK/JNK .....	102
5.3.5 Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin sowie der MAPK-Inhibitoren SB 203580 und SP 600125 auf Stabilität der IL-1 $\beta$ mRNA .....	103
5.3.6 Einfluss von Makrolid-Antibiotika und MAPK-Inhibitoren auf die transkriptionelle Regulation des IL-1 $\beta$ -Gens .....	104
5.3.6.1 Herstellung funktionsfähiger IL-1 $\beta$ -Promotorkonstrukte .....	104
5.3.6.2 Beeinflussung der Promotoraktivität von IL-1 $\beta$ durch Makrolide, das Ketolid Telithromycin und die MAPK-Inhibitoren SB 203580 und SP 600125.....	105

---

<b>6 DISKUSSION .....</b>	<b>107</b>
<b>6.1 ANTI-INFLAMMATORISCHE WIRKSAMKEIT VON ROXITHROMYCIN UND         TELITHROMYCIN BEI AKUTER LUNGENENTZÜNDUNG.....</b>	<b>107</b>
6.1.1 Induktion von Entzündungsmediatoren in der Lunge durch nasale Applikation von LPS .....	108
6.1.2 Makrolid-Antibiotika als anti-inflammatoryische Wirkstoffe bei akuter Lungenentzündung .....	109
<b>6.2 ANTI-INFLAMMATORISCHE WIRKSAMKEIT VON ROXITHROMYCIN UND         TELITHROMYCIN BEI AKUTER SYSTEMISCHER ENTZÜNDUNG .....</b>	<b>112</b>
6.2.1 Induktion von Entzündungsmediatoren durch intraperitoneale Applikation von LPS .....	112
6.2.2 Makrolid-Antibiotika als anti-inflammatoryische Wirkstoffe bei akuter systemischer Entzündung .....	114
<b>6.3 ANTI-INFLAMMATORISCHE EIGENSCHAFTEN VON MAKROLID-ANTIBIOTIKA IN         MURINEN MAKROPHAGEN .....</b>	<b>119</b>
6.3.1 Modell einer akuten LPS-induzierten Entzündungssituation unter Verwendung der murinen Makrophagen-Zelllinie J-774A.1 .....	119
6.3.2 Induktion von Zytokinen nach Stimulation mit LPS.....	119
6.3.3 Einfluss der Antibiotika auf die LPS-induzierte Zytokinbildung.....	120
6.3.4 Bedeutung der MAP-Kinasen bei der Expression von IL-1 $\beta$ und deren Beeinflussung durch Makrolid-Antibiotika.....	122
6.3.5 Einfluss der Antibiotika auf die mRNA-Stabilität von IL-1 $\beta$ .....	124
6.3.6 Einfluss von Makroliden und Ketoliden auf die transkriptionelle Regulation des IL-1 $\beta$ Gens .....	125
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>129</b>
<b>7.1 HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNGEN.....</b>	<b>129</b>
<b>7.2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>129</b>
<b>7.3 SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>131</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>132</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>149</b>
<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>153</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>154</b>
<b>LEBENSLAUF .....</b>	<b>155</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>156</b>

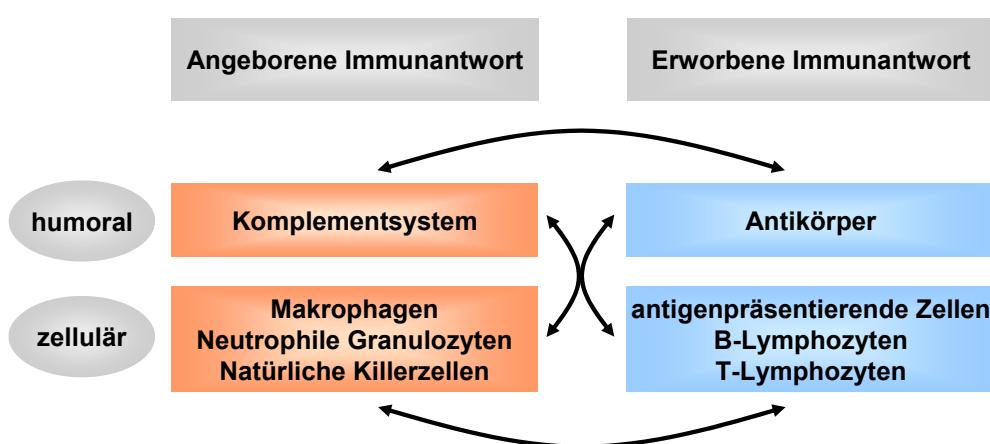
# 1 Einleitung

## 1.1 Die akute Entzündung

Die Entzündung ist eine physiologische Schutzfunktion des Organismus gegen schädigende Einflüsse von außen (z.B. Bakterien) oder innen (z.B. entartete Zellen). Sie ist die Folge einer Aktivierung des Immunsystems mit dem Ziel, den schädigenden Einfluss zu bekämpfen und zu beseitigen, die Ausbreitung der Schädigung zu verhindern und entstandene Defekte zu reparieren (Übersicht bei Egger, 2005). Zu diesem Zweck kommt es zur Erweiterung lokaler Blutgefäße (Rötung, Erwärmung), zur Einwanderung von Leukozyten und zur erhöhten Gefäßpermeabilität für Flüssigkeit und Plasmaproteine (Schwellung, Schmerz).

### 1.1.1 Überblick über das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, dem angeborenen, unspezifischen und dem erworbenen, spezifischen Immunsystem (Übersicht bei Vollmar und Dingermann, 2005). Beide Komponenten bilden zusammen einen sich ergänzenden Abwehrmechanismus gegen Fremdstoffe, unterscheiden sich aber vor allem hinsichtlich ihrer Aktivierungszeit und ihrer Lernfähigkeit (Parkin und Cohen, 2001). Eine erfolgreiche Immunantwort basiert auf der Interaktion von angeborenen und erworbenen Effektormechanismen (s. Abb. 1).



**Abb. 1: Kooperation von angeborenem und erworbenen Immunsystem bei erfolgreicher Immunantwort.**  
(modifiziert nach Vollmar und Dingermann, 2005)

Die angeborene Immunantwort dient der ersten Abwehr von Erregern. Sie wird direkt nach dem Eindringen eines Erregers aktiviert und soll die Entstehung eines Infektionsherdes verhindern oder zumindest dessen Ausbreitung verhindern (Beutler, 2004). Bestimmte Strukturmuster des Erregers werden mit Hilfe von Mustererkennungsrezeptoren, sog. pattern recognition receptors (PRR), nicht-spezifisch erkannt (Gordon, 2002). Wichtige Effektoren des unspezifischen Immunsystems sind Phagozyten (Makrophagen und neutrophile Granulozyten) und das Komplementsystem. Häufig reicht die angeborene Immunantwort alleine nicht aus, ein Pathogen erfolgreich abzuwehren; sie ist aber die Grundlage für das Auslösen der erworbenen Immunantwort, welche vom angeborenen Immunsystem kontrolliert und koordiniert wird (Medzhitov und Janeway, 1997; Pasare und Medzhitov, 2005; Schnare *et al.*, 2001).

Die erworbene Immunantwort wird nach ca. 3 - 4 Tagen aktiviert und sorgt für die gezielte Beseitigung von Pathogenen durch Generierung und Aktivierung antigenspezifischer Effektorzellen (Parkin und Cohen, 2001). Durch klonale Selektion entstehen Lymphozyten, die Antigenrezeptoren einer einzigen Spezifität tragen. Nach Kontakt mit dem Antigen durch sog. antigenpräsentierende Zellen (APC) kommt es zur Aktivierung spezifischer Effektormechanismen. B-Lymphozyten produzieren spezifische Antikörper, die extrazelluläre Antigene binden; diese Komplexe können anschließend phagozytiert werden. T-Lymphozyten unterstützen andere Effektorzellen bei der Immunabwehr oder erkennen infizierte Zellen und töten sie ab (Parkin und Cohen, 2001). Im Rahmen der erworbenen Immunantwort differenzieren B- und T-Lymphozyten zu Gedächtniszellen, die das sog. immunologische Gedächtnis bilden; das Immunsystem kann dann auf wiederholte Pathogenexposition effektiver reagieren.

## **1.1.2 Das angeborene Immunsystem**

### **1.1.2.1 Zellen der angeborenen Immunantwort**

Zunächst verhindern Epithelien, die die inneren und äußeren Körperoberflächen abdecken, das Eindringen eines Erregers. Die eigentlichen Effektoren der unspezifischen Abwehr stellen die Phagozyten dar, die den Erreger erkennen, in ihr Zellinneres aufnehmen und anschließend chemisch abbauen (Greenberg und Grinstein, 2002). Dazu produzieren sie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate (z.B Superoxid-Anionen, Stickstoffmonoxid), die für den Erreger toxisch sind (Beutler, 2004). Diese Aufgabe wird vor allem von Monozyten bzw. Makrophagen und neutrophilen Granulozyten übernommen.

Alle immunkompetenten Zellen stammen von einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark ab. Monozyten und Makrophagen gehören zur myeloischen Reihe der weißen Blutzellen. Der Monozyt stellt die noch unreife, im Blut zirkulierende Form dieses Zelltyps dar, der sich im Gewebe weiter differenzieren und spezialisieren kann, wo er dann Makrophage genannt wird. Aktivierte, phagozytierende Makrophagen locken durch Freisetzung chemotaktischer Faktoren andere Entzündungszellen wie die neutrophilen Granulozyten zum Infektionsherd (Parkin und Cohen, 2001). Diese werden aufgrund ihrer Morphologie auch polymorphe neutrophile Leukozyten (PMN) genannt. Granulozyten haben ebenfalls ihren Ursprung in der myeloischen Vorläuferzelle.

Phagozyten haben nicht nur Effektorfunktion, sie produzieren und sezernieren auch verschiedene Zytokine (z.B. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) und Lipidmediatoren (z.B. Prostaglandine, Leukotriene), die als Mediatoren der induzierten Abwehrmechanismen dienen (Smith *et al.*, 2005; Twigg, 2004). Diese freigesetzten Zytokine aktivieren Lymphozyten, die Zellen des spezifischen Immunsystems, und natürliche Killerzellen. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) stammen von der lymphatischen Vorläuferzelle ab. Es handelt sich um eine Gruppe ursprünglicher, wenig spezialisierter lymphatischer Zellen, die im Gegensatz zu den Lymphozyten keine Antigenspezifität besitzen, aber für die Abwehr intrazellulärer Erreger (z.B. Viren) von großer Bedeutung sind. Sie setzen nach ihrer Aktivierung durch chemotaktische Faktoren der Phagozyten selbst Zytokine (z.B. IFN $\gamma$ ) oder Chemokine frei (Robertson, 2002; Trinchieri, 1989), wodurch wiederum Makrophagen aktiviert werden und das Entzündungsgeschehen fortschreitet.

### 1.1.2.2 Immunmodulatoren der angeborenen Immunantwort

Die Immunantwort wird durch eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren moduliert, die sich hinsichtlich des chemischen Aufbaus und Wirkmodus unterscheiden (Nathan, 2002; Rankin, 2004).

#### Zytokine:

Bei den Zytokinen handelt es sich um Proteine oder Glykoproteine, die als Regulatorstoffe der Entzündung wie auch normaler Zellfunktionen von verschiedenen Zelltypen produziert und sezerniert werden. Zytokine, die in der angeborenen Immunantwort bzw. bei der akuten Entzündung von Bedeutung sind, werden hauptsächlich von Makrophagen und NK-Zellen produziert (Dinarello, 2000; Feghali und Wright, 1997).

Nachfolgend werden einzelne Zytokine vorgestellt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

- **Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ )**

TNF $\alpha$  ist ein nicht-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa (Goeddel *et al.*, 1986). Die aktive Form ist das Homotrimer, während Monomere nicht aktiv sind. Bei TNF $\alpha$  handelt es sich um ein hochwirksames Zytokin, das nach Kontakt mit einem Pathogen oder anderen Zytokinen bevorzugt in Makrophagen, Lymphozyten, NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten gebildet wird und seine Wirkungen sowohl lokal als auch systemisch ausübt (Aggarwal und Natarajan, 1996; Männel *et al.*, 1990). Es vermittelt seine Effekte über zwei Typen von Membranrezeptoren, dem TNF-Rezeptor Typ I (TNFR1) und Typ II (TNFR2), die auf vielen verschiedenen Zelltypen zu finden sind (Locksley *et al.*, 2001). Einerseits stimuliert TNF $\alpha$  die Produktion von anderen Zytokinen, Prostaglandin E<sub>2</sub> und Akute-Phase-Proteinen, welche die Entzündungsreaktion weiterhin aufrechterhalten. Andererseits werden Phagozyten zur Phagozytose und Freisetzung lysosomaler Enzyme und reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies angeregt. TNF $\alpha$  greift aktiv in Wachstums- und Differenzierungsvorgänge verschiedener Zelltypen ein und führt damit zur Mobilisierung und Aktivierung von Effektorzellen. Darüber hinaus übt TNF $\alpha$  auch eine zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen aus, woraufhin dieses Zytokin seinen Namen erhalten hat.

- **Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ )**

IL-1 $\beta$  ist ein nicht-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa (Dinarello, 1997). Bei seiner Synthese entsteht zunächst Pro-IL-1 $\beta$  (ca. 31 kDa), von diesem dann IL-1 $\beta$  durch das Interleukin-Converting-Enzym (ICE) abgespalten wird (Thornberry *et al.*, 1992). Gebildet und freigesetzt wird IL-1 $\beta$  hauptsächlich von Monozyten bzw. Makrophagen, jedoch sind auch neutrophile Granulozyten, Fibroblasten, Gefäßendothelzellen und Keratinozyten in der Lage, IL-1 $\beta$  zu produzieren. Es gibt viele Stimuli, die zur Freisetzung von IL-1 $\beta$  in die Umgebung bzw. ins Blut führen, darunter z.B. der Kontakt mit Mikroorganismen, Endotoxinen oder anderen Zytokinen. Zwei Typen von Interleukin-1-Rezeptoren, IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1R1) und Typ II (IL-1R2), die sich an den Membranen verschiedenster Zielzellen befinden (Sims und Dower, 1994), vermitteln die einzelnen Wirkungen von IL-1 $\beta$ , welche sich zum großen Teil mit denen des TNF $\alpha$  decken. IL-1 $\beta$  mobilisiert und aktiviert Effektorzellen (z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten) und induziert die Produktion bzw. Freisetzung von weiteren

Entzündungsmediatoren (z.B. Zytokine, Akute-Phase-Proteine, Prostaglandine, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate).

- **Interleukin-6 (IL-6)**

IL-6 ist ein an zwei Aminosäuren glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 21 kDa (Kishimoto, 1989). Es wird wie IL-1 $\beta$  vorwiegend von Makrophagen, Granulozyten, B- und T-Lymphozyten sowie Gefäßendothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten gebildet und nach Kontakt mit einem Pathogen oder anderen Zytokinen freigesetzt. Die Wirkung von IL-6 wird über den IL-6-Rezeptor vermittelt, der sich an der Membran vieler Leukozyten und anderer Zielzellen (z.B. Hepatozyten, glatte Muskelzellen, Nervenzellen) befindet. Es zeigt einen deutlichen Synergismus mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , d.h. es aktiviert und steuert lokale und systemische Entzündungsreaktionen (Hirano, 1992). IL-6 ist zudem einer der stärksten Induktoren von Akute-Phase-Proteinen (Oldenburg *et al.*, 1993).

- **Interferon gamma (IFN $\gamma$ )**

Bei IFN $\gamma$  handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa. Es wird in T-Lymphozyten und NK-Zellen produziert und von diesen nach Aktivierung durch Zytokine freigesetzt (Schroder *et al.*, 2004). Rezeptoren für IFN $\gamma$  befinden sich auf vielen hämatopoetischen Zellen wie B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen, aber auch auf Endothelzellen. Obwohl Interferone vorwiegend bei der Regulierung spezifischer Immunantworten eine Rolle spielen, sind sie auch im Bereich der unspezifischen Abwehr von Bedeutung, wenn sie von NK-Zellen sezerniert werden (Trinchieri, 1989). IFN $\gamma$  steigert die Tätigkeit von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Boehm *et al.*, 1997) und damit die Freisetzung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Des Weiteren verstärkt IFN $\gamma$  den antiviralen und Antitumoreffekt anderer Interferone und TNF $\alpha$  und steuert Wachstums- und Differenzierungsvorgänge verschiedener Zelltypen.

Bei der Freisetzung der Zytokine nach einem Entzündungsreiz wird eine gewisse zeitliche Reihenfolge eingehalten. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 werden zuerst sezerniert, auf deren Reiz hin weitere Zytokine und im weiteren Verlauf auch sekundäre Entzündungsmediatoren (z.B. Prostanoide, Stickstoffmonoxid) folgen.

## Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Prostanoide

Von der Enzymfamilie der Cyclooxygenasen (COX) existieren mindestens 3 Isoformen, COX-1, COX-2 und COX-3, die als bifunktionelle Membranproteine die Bildung von Prostaglandinen, Prostazyklin und Thromboxan A<sub>2</sub> aus der Arachidonsäure katalysieren (Smith *et al.*, 2000). In einem ersten Bisoxygenierungsschritt wird Prostaglandin G<sub>2</sub> gebildet (Cyclooxygenase-Reaktion), im zweiten Schritt erfolgt die Umwandlung in Prostaglandin H<sub>2</sub> unter Bildung von Sauerstoffradikalen (Peroxidase-Reaktion) (s. Abb. 2); aus Prostaglandin H<sub>2</sub> bilden sich schließlich die biologisch aktiven Prostaglandine, Prostazyklin und Thromboxan A<sub>2</sub> (Garavito und DeWitt, 1999; Hinz und Brune, 1999).

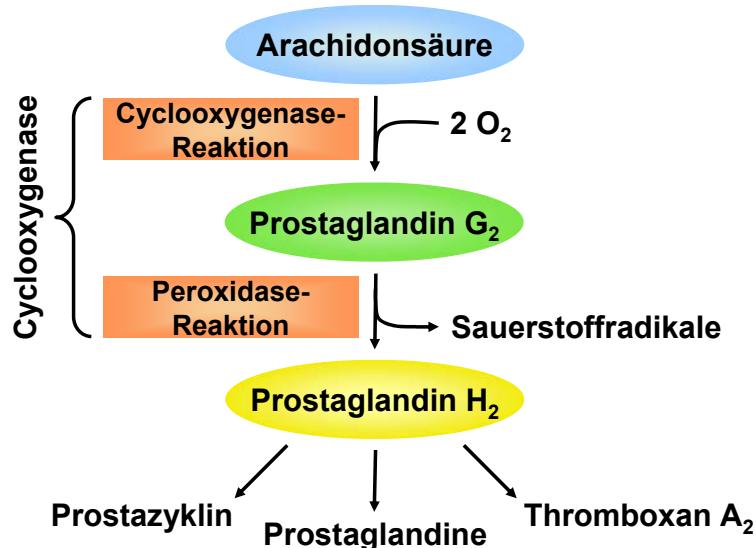


Abb. 2: Synthese von Prostaglandinen, Prostazyklin und Thromboxan A<sub>2</sub> aus Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase.

Die COX-Isoformen unterscheiden sich darin, ob sie konstitutiv exprimiert oder nur bei Bedarf induziert werden. Die COX-2 ist die induzierbare Isoform dieser Enzymfamilie und spielt bei der Entstehung der Entzündungreaktion eine wichtige Rolle. Die Bildung von COX-2 wird in vielen Zelltypen (Monozyten bzw. Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Synovialzellen) durch viele unterschiedliche Stimuli induziert (Vane *et al.*, 1998). Bei entzündlichen Prozessen ist dies insbesondere der Kontakt mit bereits sezernierten Zytokinen. In Abhängigkeit von Typ, Zustand oder Aktivierungsgrad der Zelle werden über die COX-2 verschiedene Prostaglandine wie das Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) oder Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) synthetisiert. Letzteres wird im Gefäßendothel gebildet und in die Blutbahn abgegeben. Es kann damit seine Wirkungen systemisch ausüben. Die Wirkungen der Prostanoide werden über spezifische Membranrezeptoren vermittelt (Hata und Breyer,

2004). Prostaglandine und das Prostazyklin sind Modulatoren der glatten Gefäß- und Bronchialmuskulatur und an der Entstehung von Fieber, Schmerz und Ödemen beteiligt. PGE<sub>2</sub> wirkt in Zellen der unspezifischen Abwehr jedoch auch immunsuppressiv, d.h. Effektormechanismen wie Migration oder Phagozytose sowie die Produktion und Freisetzung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, Zytokinen und anderen Mediatoren werden eingeschränkt.

### Induzierbare NO-Synthase (NOS-II) und Stickstoffmonoxid (NO)

Die NO-Synthasen katalysieren die Umwandlung der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin und produzieren dabei Stickstoffmonoxid (NO) (Moncada *et al.*, 1991; Nathan und Xie, 1994) (s. Abb. 3). Es existieren mindestens 3 Isoformen, die NOS-I, NOS-II und NOS-III, die sich u.a. darin unterscheiden, ob sie konstitutiv exprimiert oder nur bei Bedarf induziert werden.

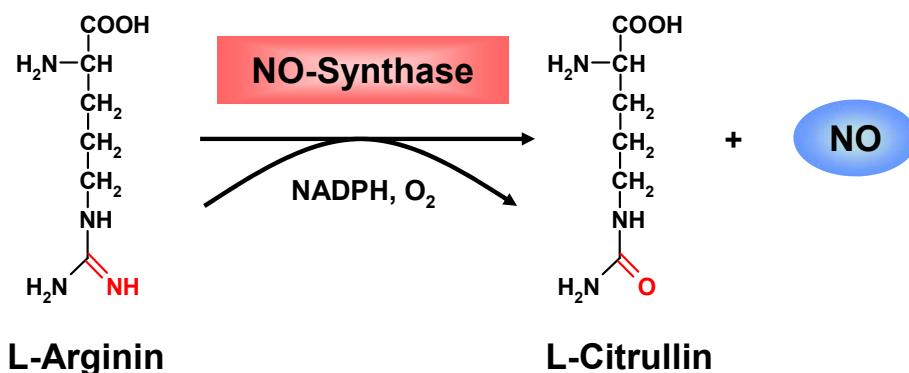


Abb. 3: Schema der NO-Synthase-Reaktion.

Die NOS-II ist die induzierbare Isoform dieser Enzymfamilie, die u.a. an der Entstehung einer Entzündungreaktion beteiligt ist. Der bevorzugte Bildungsort ist das Gefäßendothel. Außer in Endothelzellen kommt die NOS-II auch in verschiedenen Zelltypen der myeloischen und lymphatischen Reihe vor (z.B. in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten) und wird dort im Rahmen entzündlicher Prozesse *de novo* synthetisiert. Der Synthesereiz geht von verschiedenen Entzündungsmediatoren aus, darunter auch Zytokine (Robbins *et al.*, 1994), die über ihre spezifischen Rezeptoren am Endothel bzw. an der Oberfläche anderer Zielzellen die Transkription der NOS-II anregen. NO ist ein biologisches Effektormolekül, das vasodilatierend und antithrombotisch wirkt und damit am Entzündungsort bei der Regulierung der Durchblutung und der Blutgerinnung eine entscheidende Rolle spielt (Clancy *et al.*, 1998; Kroncke *et al.*, 1995). Zudem gehört NO zur Gruppe reaktiver Stickstoffspezies (Dedon und Tannenbaum, 2004), die u.a. von Phagozyten aufgenommene Pathogene abtöten können.

### 1.1.2.3 Erkennungssysteme der angeborenen Immunantwort

Die zentrale Aufgabe des Immunsystems ist die Unterscheidung von „körperfremd“ und „körpereigen“. Das angeborene Immunsystem besitzt im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem keine Spezifität, um Pathogene zu erkennen. Es verfügt nur über eine begrenzte Anzahl an Rezeptoren, die sich regelmäßig wiederholende Strukturmuster von Pathogenen erkennen und binden können und dadurch die Mechanismen der angeborenen Immunantwort aktivieren. Diese Rezeptoren bezeichnet man als Mustererkennungsrezeptoren (PRR) (Gordon, 2002); die Strukturen, die sie erkennen, werden Musterstrukturen oder pathogen-associated molecular pattern (PAMP) genannt (Medzhitov und Janeway, 2000). PRR sind keimbahncodiert, d.h. alle Zellen einer bestimmten Art tragen identische PRR. Sie lassen sich funktionell in drei Klassen einteilen: sezernierende, endozytierende und signaltransferierende Mustererkennungsrezeptoren (Janeway und Medzhitov, 2002).

Sezernierende PRR binden an mikrobielle Zellwände bzw. Antigene und markieren sie zur weiteren Erkennung durch das Komplementsystem oder Phagozyten. Endozytierende PRR sind auf der Oberfläche von Phagozyten lokalisiert. Nach Erkennung des Pathogens erfolgt dessen Aufnahme und Zerstörung in Lysosomen. Signaltransferierende Rezeptoren sind durch die Fähigkeit gekennzeichnet, die Information der Pathogenerkennung über Signalkaskaden weiterzuleiten, um die Expression verschiedener proinflammatorischer und regulatorischer Gene zu induzieren.

### 1.1.3 Toll-like Rezeptor-4 vermittelte Immunantwort

#### 1.1.3.1 Toll-like Rezeptoren und Lipopolysaccharid

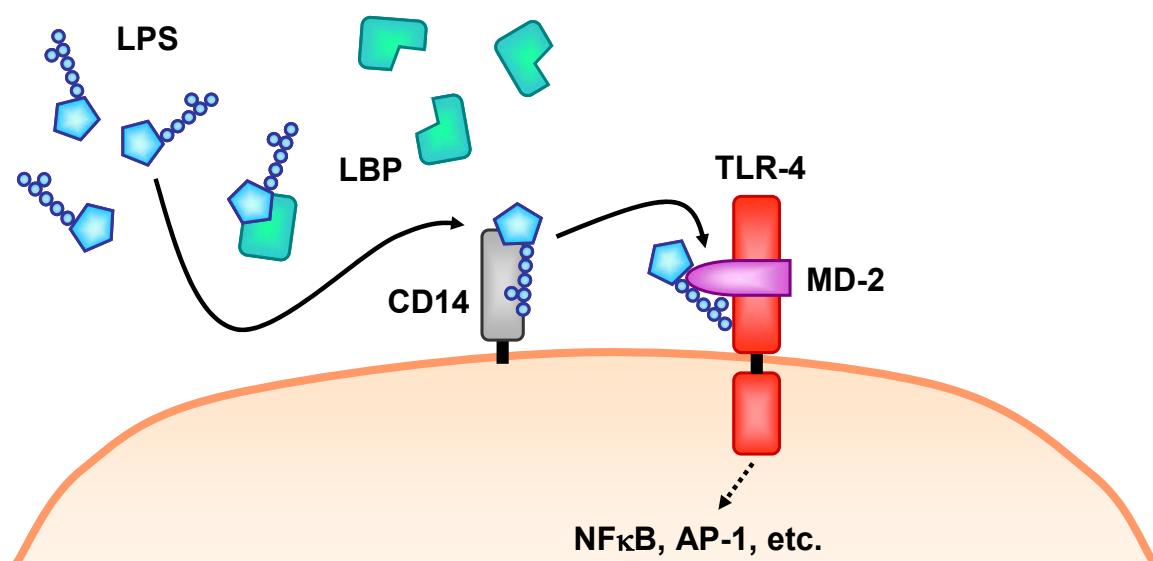
Wichtige Vertreter der Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems sind die Toll-like Rezeptoren (TLR). Sie erhielten ihren Namen aufgrund ihrer Homologie zum Toll-Rezeptor der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, der bei durch Gram-positive Bakterien und Pilze ausgelösten Immunantworten von entscheidender Bedeutung ist (Medzhitov *et al.*, 1997). In Säugetieren sind 11 verschiedene TLR bekannt, die sich nach der Art ihrer Liganden und der Notwendigkeit spezieller akzessorischer Proteine unterscheiden (Takeda und Akira, 2005). Einige TLR erkennen ein breites Spektrum mikrobieller Produkte wie Lipoproteine, Lipopolysaccharide oder Peptidoglykane, während andere TLR von Nukleinsäure-Motiven aktiviert werden (Takeda *et al.*, 2003).

Der Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) ist einer der am besten untersuchten Vertreter dieser Rezeptorfamilie. Endogene Liganden von TLR-4 sind z.B. die Hitzeschockproteine HSP 60

und HSP 70 (Asea *et al.*, 2002; Vabulas *et al.*, 2002) sowie Fibronectin (Okamura *et al.*, 2001). Sein Hauptligand ist das Lipopolysaccharid (LPS). LPS, ein Endotoxin, ist ein Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien, bestehend aus einem Polysaccharid- und einem Lipid-Anteil (Erridge *et al.*, 2002; Raetz und Whitfield, 2002). Die in LPS konservierten sog. Lipid-A-Strukturen sind für Gram-negative Bakterien charakteristisch und stellen das endotoxische Prinzip von LPS dar. Die Aktivierung des TLR-4 durch LPS führt zur Produktion proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) (Guha und Mackman, 2001) und in der Folge zur Ausbildung eines akuten Entzündungsgeschehens mit Fieber oder im schlimmsten Fall auch zur Ausbildung eines septischen Schocks, der mit Vasodilatation, Hypotonie, systemischen Ödem, Neutropenie und anderen metabolischen Entgleisungen sowie Multiorganversagen einhergeht (Gutierrez-Ramos und Bluethmann, 1997).

### 1.1.3.2 Erkennung von LPS durch TLR-4

TLR-4 ist ein Typ I Transmembranrezeptor, dessen Extrazellulär-Teil aus sog. Leucin-reichen Regionen (LRR) besteht, während der intrazelluläre Teil eine dem Interleukin-1-Rezeptor homologe Domäne, die sog. Toll/IL-1-Rezeptor-(TIR)-Domäne, enthält. Die extrazelluläre Domäne ist direkt an der Erkennung von LPS beteiligt, die zytoplasmatische TIR-Domäne hingegen ist essentiell für die nachfolgende Signalübertragung (Akira, 2003; Dunne und O'Neill, 2003). Die Erkennung von LPS durch TLR-4 benötigt die akzessorischen Proteine LBP, CD14 und MD-2 (Shimazu *et al.*, 1999; Ulevitch und Tobias, 1999) (s. Abb. 4).



**Abb. 4: Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS) durch den Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4).** LPS wird von dem Serumprotein LBP zuerst auf den membranständigen Rezeptor CD14 und von diesem schließlich auf den TLR-4/MD-2 Rezeptorkomplex übertragen. Diese Interaktion mit TLR-4 führt zur Aktivierung nachfolgender Signalkaskaden.

Das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) ist ein lösliches Serumprotein aus der Gruppe der Akute-Phase-Proteine. Es ist ein Vertreter der sezernierten PRR, das LPS erkennt, bindet und als LPS/LBP-Komplex zur Oberfläche der Zielzellen transportiert (Schumann *et al.*, 1990). Dort wird LPS aus dem LPS/LBP-Komplex auf das Glykoprotein CD14, einen membranständigen Rezeptor ohne intrazelluläre Domäne, übertragen (Goyert *et al.*, 1988; Schumann, 1992; Wright *et al.*, 1990). CD14 interagiert anschließend mit dem TLR-4/MD-2 Rezeptorkomplex. Das Glykoprotein MD-2 ist mit der extrazellulären Domäne des TLR-4 assoziiert und stellt das entscheidende Molekül im TLR-4/MD-2 Rezeptorkomplex dar, da nur MD-2 in der Lage ist, LPS zu binden (Nagai *et al.*, 2002; Shimazu *et al.*, 1999; Viriyakosol *et al.*, 2001). Wird LPS auf den Rezeptorkomplex übertragen, kommt es zur Aktivierung des TLR-4. Es bilden sich TLR-4 Aggregate, die in die Zelle internalisiert werden (Latz *et al.*, 2002; Visintin *et al.*, 2003) und über verschiedene Signalwege zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit zur Transkription immunologisch aktiver Gene führen (Jones *et al.*, 2001).

#### 1.1.3.3 Signaltransduktionswege des TLR-4

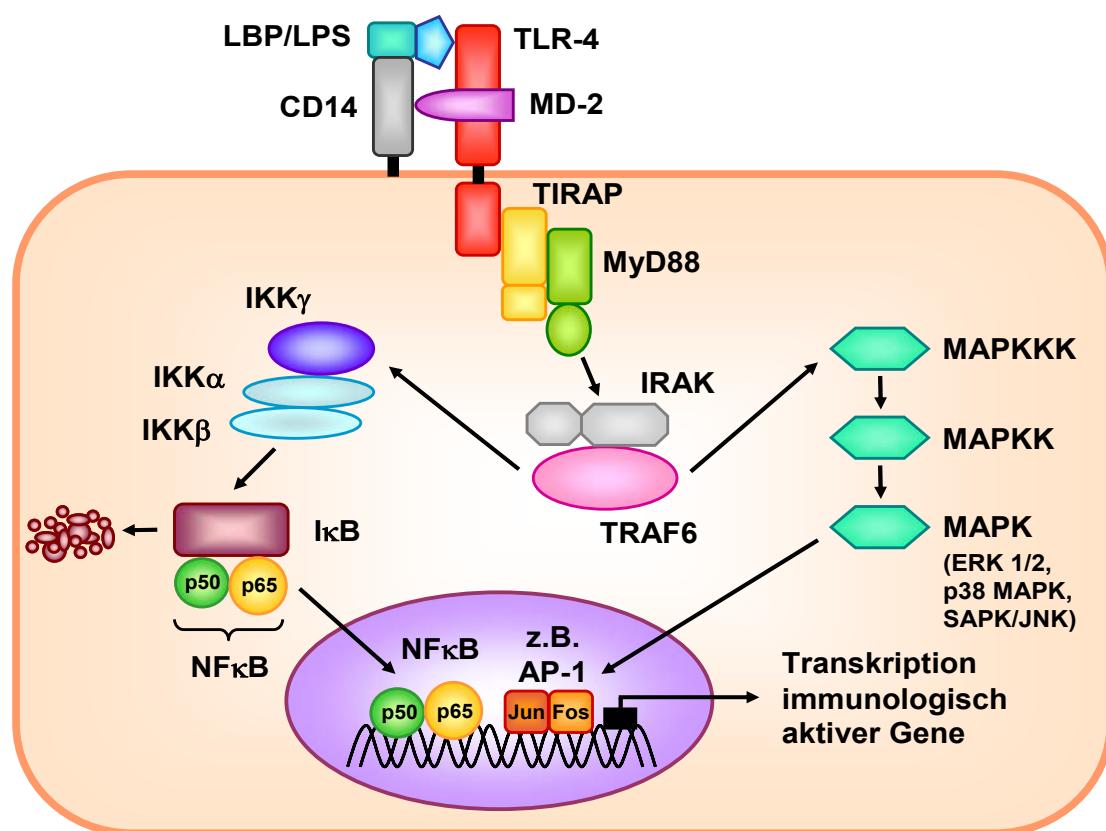
Die Bindung des Liganden an TLR-4 führt zur Konformationsänderung der intrazellulären TIR-Domäne mit nachfolgender Rekrutierung und Assoziation einer Reihe verschiedener Adaptorproteine, wie MyD88, TIRAP, IRAK und TRAF6 (Aderem und Ulevitch, 2000; Dunne und O'Neill, 2005) (s. Abb. 5).

Das Adaptorprotein TIRAP (TIR domain containing adaptor protein) interagiert einerseits mit der TIR-Domäne von TLR-4 (Horng *et al.*, 2002) und andererseits mit einem weiteren Adaptorprotein, dem MyD88 (myeloid-differentiation-protein 88) (Fitzgerald *et al.*, 2001). Die N-terminale Todesdomäne (death domain, DD) von MyD88 bindet an die Todesdomäne der Serin-Threonin Kinase IRAK (IL-1 receptor associated kinase). Es kommt zur Autophosphorylierung von IRAK (Palsson-McDermott und O'Neill, 2004), wodurch sich dieses vom Rezeptorkomplex ablöst und mit TRAF6 (TNF receptor associated factor 6), einem weiteren Adaptorprotein, interagiert (Arch *et al.*, 1998; Medzhitov, 2001). Die nachfolgende Signaltransduktion kann in verschiedene Richtungen verlaufen.

Zum einen aktiviert TRAF6 über die Kinase TAK1 (transforming growth factor- $\beta$  activated kinase) die I $\kappa$ B-Kinasen  $\alpha$  und  $\beta$  (IKK $\alpha$  bzw. IKK $\beta$ ), die zusammen mit IKK $\gamma$  den sog. IKK-Komplex bilden (Palsson-McDermott und O'Neill, 2004). Diese Kinasen phosphorylieren das inhibitorische Protein I $\kappa$ B (Takeda und Akira, 2005), welches mit dem Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) assoziiert vorliegt. Die Phosphorylierung führt zur Degradation von

I $\kappa$ B und dem Freisetzen von NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B ist ein Dimer, bestehend aus den Untereinheiten p50 und p65, das nun im aktiven Zustand in den Zellkern transloziert und dort die Transkription verschiedener proinflammatorischer Gene reguliert (Ghosh *et al.*, 1998; Karin und Ben-Neriah, 2000).

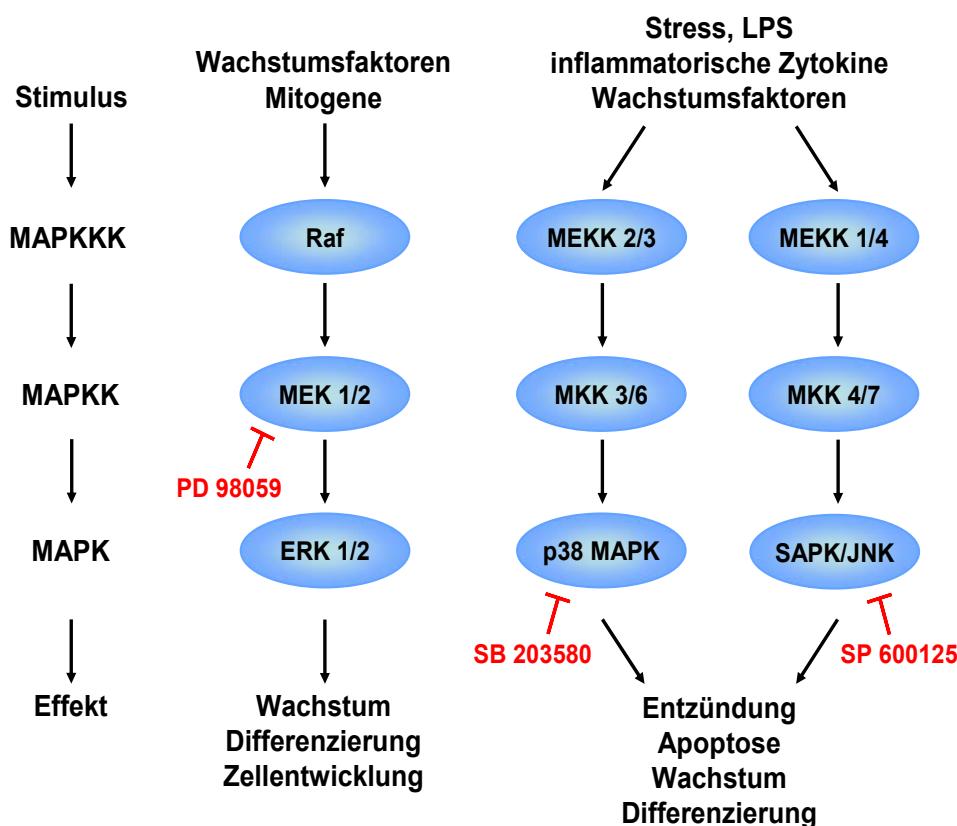
Ein weiterer Signalweg, der von TRAF6 ausgehen kann, ist die Aktivierung von Proteinkinasen der Familie der MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases) (Kopp *et al.*, 1999). Dies führt schließlich zur Induktion von Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 (activator protein-1) und Elk-1, welche die Expression verschiedener Gene der Immunantwort regulieren (Guha und Mackman, 2001).



**Abb. 5: Signaltransduktion über den Toll-like Rezeptor-4.** Die Bindung des Liganden an TLR-4 führt zur Assoziation der Adaptorproteine TIRAP, MyD88, IRAK und TRAF6. Durch Aktivierung des IKK-Komplexes wird das inhibitorische Protein I $\kappa$ B phosphoryliert und abgebaut, wodurch der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B freigesetzt wird und in den Zellkern transloziert kann. TRAF6 aktiviert auch mitogenaktivierte Proteinkinasen (ERK 1/2, p38 MAPK und SAPK/JNK), die ihrerseits verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 phosphorylieren. Die aktivierte AP-1 führt im Zellkern die Transkription immunologisch aktiver Gene ein.

#### 1.1.3.4 Mitogenaktivierte Proteinkinasen

Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie z.B. Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose sowie zellulärer Antworten z.B. im Rahmen des Entzündungsgeschehens beteiligt. Es handelt sich dabei um ein Kaskadensystem aus mindestens 3 hintereinander geschalteten Proteinkinasen – der MAP-Kinase, einem Aktivator der MAP-Kinase (MAP-Kinase Kinase, MKK, MAPK/ERK Kinase, MEK) und einer MAP-Kinase Kinase Kinase (MAPKKK, MKKK, MEK-Kinase), die infolge unterschiedlicher Stimuli aktiviert, d.h. phosphoryliert werden und durch Phosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren zur Expression neuer Gene führen (English *et al.*, 1999) (s. Abb. 6). Am bekanntesten und besten untersucht sind die durch ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase, auch p44/42 MAPK genannt), SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) und p38 MAPK vermittelten Signaltransduktionswege (Chen *et al.*, 2001).



**Abb. 6: Aktivierung verschiedener MAP-Kinase Signalkaskaden durch extrazelluläre Stimuli.** Die ERK 1/2, p38 und SAPK/JNK Signalkaskaden basieren auf der gleichen Abfolge dreier Kinasen. Eine MAP-Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) phosphoryliert und aktiviert eine MAP-Kinase Kinase (MAPKK), welche dann ihrerseits eine MAP-Kinase (MAPK) phosphoryliert und aktiviert.

Die ERK 1/2 (bzw. p44/42 MAPK) Signalkaskade wurde als erstes charakterisiert. Diese Kaskade wird von Ras-Proteinen aufgrund verschiedener Stimuli wie z.B. Mitogene und

Wachstumsfaktoren oder auch Aktivierung G-protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert (Moodie und Wolfman, 1994). In der Folge werden die MAPKKK der Raf-Familie rekrutiert, um MEK 1 bzw. MEK 2 zu phosphorylieren. Diese wiederum aktivieren ERK 1 und ERK 2 (Cobb und Goldsmith, 1995), was zu deren Dimerisierung führt. Die ERK-Dimere translozieren in den Zellkern, wo sie diverse Transkriptionsfaktoren (z.B. Elk-1) phosphorylieren und damit aktivieren (Davis, 1995). Über die Aktivierung der ERK-Proteine werden Prozesse wie Zellwachstum und Zelldifferenzierung initiiert.

Die SAPK/JNK- und p38 MAPK-Signalkaskade werden durch Stress (z.B. Hitze, UV-Strahlung) und inflammatorische Stimuli (z.B. LPS, Zytokine) aktiviert (Kyriakis und Avruch, 2001; Shi und Gaestel, 2002). Eine Vielfalt von MAPKKK wurde beschrieben, die den Fortgang im Kaskadensystem infolge der vielen verschiedenen Stimuli vermitteln (Johnson *et al.*, 2005). Sie lassen sich in 3 Familien einteilen: die MEKK1-4 Proteine, die MLK (mixed lineage kinases) und die TAO („thousand and one kinases“). Ebenso wie die ERK-Proteine phosphorylieren und aktivieren die SAPK/JNK- und p38-Proteine im Zellkern verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Jun, ATF-2, Elk-1) (Dong *et al.*, 2002) oder auch andere Proteinkinasen (z.B. MAPK activated protein kinase 2, MAPKAPK-2) (Roux und Blenis, 2004). Die Phosphorylierung von c-Jun durch SAPK/JNK führt zur erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 (Shaulian und Karin, 2002). Infolge der Aktivierung der p38 MAPK oder SAPK/JNK kommt es zur Transkription spezifischer Gene (Su und Karin, 1996), die neben der Regulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung insbesondere zu einem Fortschreiten der Entzündungsreaktion oder auch zur Apoptose führen.

Es wurden viele verschiedene Inhibitoren der MAP-Kinasen entwickelt, um die einzelnen Signaltransduktionswege selektiv hemmen zu können. PD 98059, ein selektiver Inhibitor des p44/42 MAPK-Signalwegs (Dudley *et al.*, 1995), bindet an die inaktive Form von MEK 1 und blockiert damit die Phosphorylierung, die zur Aktivierung der MEK benötigt wird. Mit SB 203580 steht ein Inhibitor des p38 MAPK-Signalwegs zur Verfügung, der sich in die ATP-Bindungstasche der p38 MAPK setzt und damit die Bindung von ATP hemmt (Tong *et al.*, 1997). SP 600125 ist ein selektiver Inhibitor der SAPK/JNK, der mit ATP um die Bindungstelle der Kinase konkurriert und damit die Aktivierung der SAPK/JNK hemmt (Bennett *et al.*, 2001).

## 1.2 Makrolid-Antibiotika

Bei den Makroliden handelt es sich um eine gut etablierte Klasse antibiotisch wirksamer Arzneistoffe, die bei der Chemotherapie verschiedener Infektionskrankheiten eine Rolle spielen ((Übersicht bei Schönenfeld und Kirst, 2002). Makrolide sind oral applizierbar, haben ein breites Wirkpektrum und eine hohe therapeutische Sicherheit. Sie sind daher auch das Alternativ-Antibiotikum der Wahl, wenn beispielsweise Penicilline aufgrund von Allergien für die Therapie der Infektion nicht in Frage kommen.

Der Prototyp der Makrolide ist das Erythromycin, welches 1952 aus *Streptomyces erythreus* isoliert wurde (McGuire *et al.*, 1952). Seither wurden zahlreiche semi-synthetische Derivate von Erythromycin entwickelt, die sich durch erhöhte chemische Stabilität und bessere pharmakokinetische Eigenschaften auszeichnen (Bryskier, 1997).

### 1.2.1 Struktur der Makrolide

Makrolide sind makrozyklische Lactone. Bei den klinisch bedeutsamen Wirkstoffen wird zwischen zwei Familien unterschieden, den 14- und den 16-gliedrigen Makroliden. Die Leitsubstanz Erythromycin besteht aus einem 14-gliedrigen Lactonring mit einer Ketofunktion an C(9) und Hydroxylgruppen an den Positionen C(6), C(11) und C(12) (s. Abb. 7). Dieses Grundgerüst ist mit zwei Zuckermolekülen jeweils über glykosidische Bindungen verknüpft, an C(3) über eine  $\alpha$ -glykosidische Bindung der neutrale Zucker Cladinose und an C(5) über eine  $\beta$ -glykosidische Bindung der Amino-Zucker Desosamin (Harris *et al.*, 1965).

Erythromycin ist chemisch sehr instabil, insbesondere unter sauren Bedingungen. Unterhalb eines pH-Werts von 4 kommt es zu einer irreversiblen intramolekularen Ketalisierung zwischen der Carbonylgruppe an C(9) und der OH-Gruppe an C(6), was zum Verlust der antibakteriellen Wirkung führt. In den neueren semi-synthetischen Derivaten Roxithromycin und Clarithromycin ist die Säurestabilität durch Modifikationen an C(9) oder C(6) deutlich erhöht (Kirst, 1993). Die Erweiterung des Ringsystems und die Integration eines Stickstoff-Atoms ins Grundgerüst führten zu Azithromycin und damit zu 15-gliedrigen Untergruppe der Azalide (Ballow und Amsden, 1992). Die neueste Gruppe semi-synthetischer Derivate wird Ketolide genannt (Bryskier, 2000; Zhanel *et al.*, 2002). Der neutrale Zucker Cladinose wurde entfernt und durch eine Ketofunktion ersetzt. Der erste Vertreter der Ketolide ist das

Telithromycin, welches sich durch ein erweitertes Wirkspektrum (Zhanel und Hoban, 2002) und eine geringere Resistenzentwicklung auszeichnet (Agouridas *et al.*, 1998).

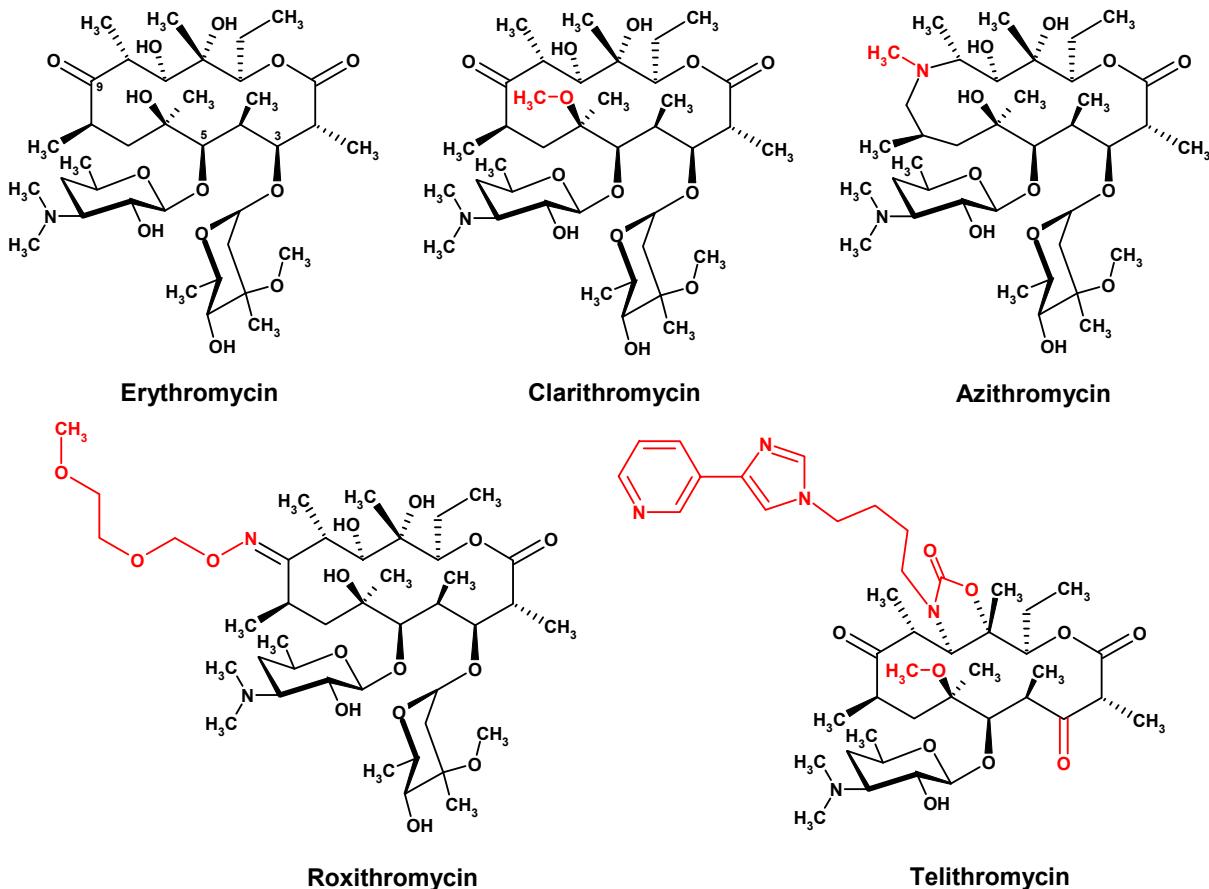


Abb. 7: Struktur verschiedener Makrolide und des Ketolids Telithromycin.

Da 16-gliedrige Makrolide im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, werden sie an dieser Stelle nur kurz erwähnt. Vertreter der Familie der 16-gliedrigen Makrolide sind z.B. Josamycin und Spiramycin (Katz und Ashley, 2005). Sie tragen an ihrem 16-gliedrigen Lactonring typischerweise Disaccharid-Substituenten. Die 16-gliedrigen Makrolide haben den 14-gliedrigen Makroliden vergleichbare Eigenschaften, spielen aber in der therapeutischen Praxis nur eine untergeordnete Rolle.

### 1.2.2 Wirkmechanismus und Wirkspektrum der Makrolide

Makrolid-Antibiotika greifen am bakteriellen Ribosom an, wo sie die Proteinbiosynthese hemmen (Goldman und Scaglione, 2004).

Bakterielle Ribosomen bestehen aus einer kleinen 30S-Untereinheit und einer großen 50S-Untereinheit. Es handelt sich dabei um Komplexe, die aus einzelsträngiger ribosomaler RNA (16S-rRNA bei der 30S-Untereinheit bzw. 23S-rRNA bei der 50S-Untereinheit) und

Proteinen bestehen (Lafontaine und Tollervey, 2001; Noller, 1984). Nachdem sich die zu translatierende mRNA, verschiedene Initiationsproteine und die entsprechende tRNA an die 30S-Untereinheit angelagert haben, bindet auch die 50S-Untereinheit unter Bildung des 70S-Initiationskomplexes (s. Abb. 8). Dieser enthält zwei funktionelle Bindungsstellen für tRNA-Moleküle: die P-Stelle, an der sich die Peptidyl-tRNA mit der zu verlängernden Peptidkette anlagert, und die A-Stelle, an der die Aminoacyl-tRNA mit der neu anzuknüpfenden Aminosäure bindet (Nissen *et al.*, 2000). In der Elongationsphase der Proteinsynthese wird nun schrittweise die durch Basentriplets vorgegebene genetische Information der mRNA unter Beteiligung von Elongationsfaktoren und Aminoacyl-tRNA in eine Aminosäureabfolge umgesetzt (Ramakrishnan, 2002). Bindet die Aminoacyl-tRNA im Bereich der A-Stelle an das Basentriplett der mRNA wird die an ihr sitzende Aminosäure mittels einer Peptidyltransferase – diese knüpft Peptidbindungen zwischen Aminosäuren – mit der zu verlängernden Peptidkette der Peptidyl-tRNA der P-Stelle verbunden (Nissen *et al.*, 2000). Die freie Peptidyl-tRNA verlässt danach die P-Stelle und der neu geknüpfte Peptidketten-Aminosäure-tRNA-Komplex kann in die P-Stelle rücken, indem sich das Ribosom relativ zur mRNA um ein Basentriplett verschiebt (Green und Noller, 1997). Die A-Stelle ist damit für den nächsten Syntheseschritt wieder freigegeben und der Zyklus beginnt von neuem.

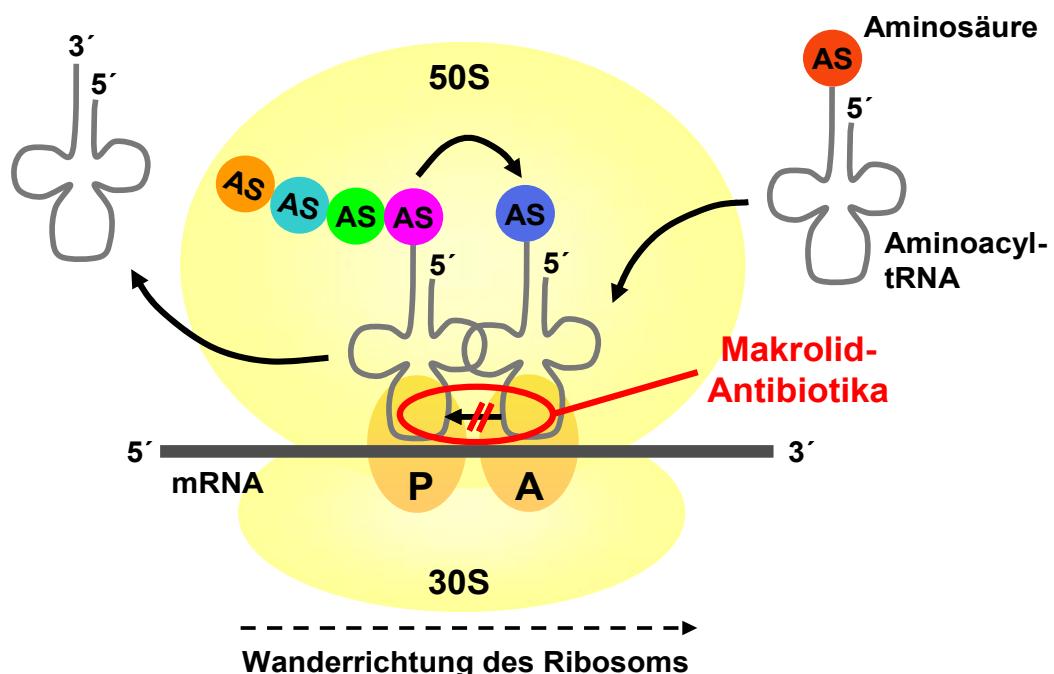


Abb. 8: Angriffspunkt der Makrolid-Antibiotika in der bakteriellen Proteinbiosynthese.

Makrolide und Ketolide binden an überlappende, aber nicht identische Bindungsstellen im Bereich der Engstelle des Peptidkanals, in dem die mRNA durch das Ribosom

hindurchwandert (Moazed und Noller, 1987; Poehlsgaard und Douthwaite, 2005) (s. Abb. 8). Dieser Tunnel wird von bestimmten Nukleotiden der 23S-rRNA der 50S-Untereinheit und ribosomalen Proteinen geformt. Makrolide interagieren dort mit dem Nukleotid A2058, indem sie mit einer Hydroxylgruppe des Desosamin Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (Hansen *et al.*, 1999). Ketolide gehen darüber hinaus noch weitere Bindungen mit dem Nukleotiden A752 und/oder U2609 ein (Bertho *et al.*, 1998; Douthwaite *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 1999). Die Antibiotika blockieren dadurch das Weiterrücken der mRNA und in der Folge die Verlängerung der Peptidkette, woraus eine bakteriostatische Wirkung dieser Substanzklasse resultiert (Katz und Ashley, 2005; Menninger und Otto, 1982).

Das Wirkungsspektrum der Makrolid-Antibiotika umfasst vor allem Erreger bakterieller Atemwegserkrankungen. Viele Atemwegsinfektionen werden von *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* verursacht. Erythromycin, Roxithromycin, Clarithromycin und Azithromycin haben eine gute Wirksamkeit gegen *Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* (Alvarez-Elcoro und Enzler, 1999; Bryskier, 1998), jedoch ist gegen *Haemophilus influenzae* nur Azithromycin deutlich aktiv (Lode *et al.*, 1996). Telithromycin zeigt eine verbesserte Wirkung gegen grampositive Erreger und kann auch bei Infektionen mit Erythromycin- und Penicillin-resistenten Pneumokokken-Infektionen eingesetzt werden (Felmingham, 2001). Es hat eine mit Azithromycin vergleichbare Aktivität gegen *Haemophilus influenzae* und wirkt auch gegen einige Staphylokokken-Stämme (Lonks und Goldmann, 2005; Low *et al.*, 2004). Chlamydien, Mykoplasmen und Legionellen werden von Makroliden und Ketoliden gleichermaßen erfasst. Bei längerer Anwendung von Makroliden kommt es zur sog. MLS-Resistenz (Makrolid-Lincosamin-Streptogramin-Resistenz) der Bakterien (Katz *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1999; Weisblum, 1995). Die Bakterien exprimieren u.a. Methyltransferasen (Retsema und Fu, 2001; Uchiyama und Weisblum, 1985), die die Aminogruppe des Nukleotids A2058 methylieren, wodurch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Makroliden verhindert wird. Ketolide induzieren dagegen keine MLS-Resistenz (Chu, 1999; Goldman und Scaglione, 2004), da diese noch mit einem weiteren Nukleotid interagieren, wodurch eine stärkere Ribosomenbindung erreicht wird.

### 1.2.3 Pharmakokinetische Eigenschaften der Makrolide

Unterschiede zwischen den einzelnen Vertretern der Makrolide bestehen in deren pharmakokinetischem Verhalten (Kirst und Sides, 1989; Nilsen, 1995) (vgl. Tab. 1). Makrolide werden vorwiegend oral eingenommen. Die orale Bioverfügbarkeit unterliegt

jedoch starken Schwankungen, da viele Makrolide – auch in Abhängigkeit von der Nahrung – nur langsam und unvollständig resorbiert werden. Erythromycin wird in Form von Salz- oder Esterverbindungen eingesetzt (Kirst, 1993), um die Stabilität im Magensaft und damit auch die orale Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Diese liegt jedoch nur bei ca. 25 %. Nachteilig ist auch die kurze Halbwertszeit, was eine mehrmalige Einnahme am Tag erforderlich macht (Houin *et al.*, 1980). Clarithromycin und Roxithromycin weisen dagegen eine bessere chemische Stabilität, damit eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit von 50 – 60 % und eine längere Halbwertszeit auf, so dass mit niedrigeren Tagesdosen und höheren Dosierungsintervallen vergleichbare oder auch höhere Plasmakonzentrationen erreicht werden (Lassman *et al.*, 1988; Rodvold, 1999). Azithromycin hat dagegen eine relativ niedrige Plasmakonzentration und besitzt eine orale Bioverfügbarkeit von nur ca. 40%, zeichnet sich aber durch eine sehr lange Eliminationshalbwertszeit von bis zu 2 Tagen aus, die ein Dosierungsintervall von 24 Stunden und eine nur 3tägige Anwendungsdauer erlaubt (Lalak und Morris, 1993). Das Ketolid Telithromycin wird schnell resorbiert und erreicht eine orale Bioverfügbarkeit von ca. 57 % (Namour *et al.*, 2001). Die Halbwertszeit beträgt ca. 10 – 14 h, so dass nur eine einmalige Dosis am Tag nötig ist.

Wirkstoff	Tages-dosis (mg)	Bioverfüg-barkeit (%)	Halbwerts-zeit (h)	C <sub>max</sub> (mg/l)	Interaktion mit Cytochrom-P450-Enzymen	Elimination
Erythromycin	2000	ca. 25 %	1,7	1,8	+++	v. a. biliär
Clarithromycin	1000	50 %	4,7	2,1	++	renal (38 %) und biliär (40%)
Roxithromycin	300	60 %	10,5 – 11,9	10,8	+	renal (12 %) und biliär (53%)
Azithromycin	500	40 %	10 – 40	0,45	-	renal (>12 %) und biliär (50%)
Telithromycin	800	57 %	10 - 14	2	+++	renal (17 %) und biliär (75%)

**Tab. 1: Pharmakokinetik und Interaktionen von Makrolid-Antibiotika.**

Makrolid-Antibiotika werden größtenteils in der Leber metabolisiert und hauptsächlich biliär eliminiert. Eine große Rolle spielt die Verstoffwechslung über Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen, insbesondere das Isoenzym CYP3A4 (Rodrigues *et al.*, 1997). Erythromycin, Clarithromycin und Telithromycin hemmen dieses Enzym (Lindstrom *et al.*, 1993; Ohmori *et al.*, 1993; Westphal, 2000; Zhanell *et al.*, 2002), so dass es zu Interaktionen mit anderen Arzneistoffen (z.B. Benzodiazepine, Statine, Immunsuppressiva) kommt, die

ebenfalls durch diese CYP-Enzym abgebaut werden. Bei Roxithromycin ist diese Interaktion weit weniger ausgeprägt, Azithromycin scheint keine Beeinflussung des Cytochrom-P450-Systems zu bewirken (Amsden, 1995).

Eine Besonderheit der Makrolide ist ihre hohe intrazelluläre Anreicherung in Phagozyten (Bonnet und Van der Auwera, 1992; Bosnar *et al.*, 2005; Vazifeh *et al.*, 1997). Diesbezüglich werden verschiedene Aufnahmemechanismen diskutiert. Zum einen gelangen Makrolide über die passive Diffusion entlang eines pH-Gradienten (Gladue *et al.*, 1989), zum anderen über ein aktives Transportsystem ins Zellinnere neutrophiler Granulozyten (Abdelghaffar *et al.*, 2001; Labro *et al.*, 2005). Aufgrund der Einwanderung dieser Zellen in Entzündungsherde werden auf diese Weise hohe lokale Konzentrationen an Makroliden erreicht.

## 1.3 Diffuse Panbronchiolitis

Die Diffuse Panbronchiolitis (DPB) ist eine in Europa und Amerika praktisch unbekannte Form einer konstriktiven Bronchiolitis, die aber eine signifikante Prävalenz in Japan, China und Korea hat (Übersicht bei Rubin und Tamaoki, 2005). Charakteristisch sind eine Entzündung und Verengung der kleinen Atemwege. Obwohl einige Ähnlichkeiten zu anderen chronischen Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale oder COPD (chronic obstructive pulmonary disease) bestehen, handelt es sich um unterschiedliche Krankheitsbilder (Iwata *et al.*, 1994).

### 1.3.1 Klinische Symptome, Epidemiologie und Ursachen der diffusen Panbronchiolitis

Die Erkrankung wurde in den 1960iger Jahren erstmals in Japan beschrieben und als eine von anderen Formen chronischer Atemwegserkrankungen verschiedene Form erkannt (Kudoh und Keicho, 2003). Sie manifestiert sich meist erst im Erwachsenenalter und ist gekennzeichnet durch eine eingeschränkte Lungenfunktion: die Einsekundenkapazität beträgt weniger als 70 %, die Vitalkapazität weniger als 80 % des Lungengesunden (Homma *et al.*, 1983). Computertomographische Aufnahmen der Lunge zeigen kleine diffuse Knoten am Ende bronchovaskulärer Gefäße (Akira *et al.*, 1988; Ichikawa *et al.*, 1995), die Entzündungszellen wie z.B. neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten enthalten (Ichikawa *et al.*, 1990), die in die Wände von Bronchiolen infiltrieren und zahlreiche Entzündungsmediatoren bilden (Yanagihara *et al.*, 2001). Patienten entwickeln schließlich

eine Anamnese mit chronischer Sinusitis, chronischem Husten mit eitrigem Auswurf, pfeifende und rasselnde Atemgeräusche und Atemnot.

Epidemiologische Studien ergaben für Japan 1980 mehr als 1000 mögliche Fälle von DPB (Homma *et al.*, 1983; Homma, 1986). In den 1990iger Jahren wurden ebenfalls Fälle von DPB in China und Korea beschrieben (Kim *et al.*, 1992). Im Sputum lassen sich häufig Erreger bakterieller Atemwegserkrankungen wie *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* nachweisen. Diese sind allerdings nicht spezifisch für DPB und werden nicht als ursächlich angesehen (Yanagihara *et al.*, 2001). Auch Umweltfaktoren scheiden als Ursache aus, da z.B. nur 30 % der betroffenen Patienten Raucher sind.

Die Tatsache, dass sich DPB vornehmlich in Ostasien entwickelt, legt den Bezug zu einer genetischen Prädisposition nahe. In Japan wird HLA-B54 (human leukocyte antigen B54), ein ethnisch auf die ostasiatischen Bevölkerung beschränktes Antigen, als prädisponierend für eine Erkrankung mit DPB angenommen (Keicho *et al.*, 1998; Sugiyama *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu wird in Korea ein anderes Antigen, HLA-A11, mit einer genetischen Prädisposition in Verbindung gebracht (Park *et al.*, 1999). Aufgrund des ähnlichen genetischen Hintergrunds von Japanern und Koreanern wird vermutet, dass das prädisponierende Gen dieser Erkrankung zwischen den HLA-A und HLA-B Loci des major histocompatibility complex class I (MHC-I) auf Chromosom Nr. 6 lokalisiert ist (Keicho *et al.*, 2000; Matsuzaka *et al.*, 2002).

### **1.3.2 Einsatz von Makrolid-Antibiotika in der Therapie der diffusen Panbronchiolitis**

Eine unspezifische Behandlung der Patienten mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Kortikosteroiden,  $\beta_2$ -Sympathomimetika oder Mukolytika bessert zwar die Symptome der DPB, aber nicht die Prognose und den natürlichen Verlauf der Erkrankung. Die 5-Jahres-Überlebensrate ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung beträgt nur ca. 63 %. Dies änderte sich drastisch mit der Einführung der niedrig-dosierten Erythromycin-Therapie im Jahr 1982 (Kudoh *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 1991). Eine Tagesdosis von 400-600 mg Erythromycin über einen Zeitraum von mehreren Monaten verbesserte die klinischen Erscheinungsbilder der DPB (Ichikawa *et al.*, 1995) und erhöhte die 5-Jahres-Überlebensrate auf über 90 % (Kudoh *et al.*, 1998). Der Einsatz von Roxithromycin und Clarithromycin in den 1990igern zeigt eine gleiche oder auch bessere Effektivität in der Behandlung der DPB (Shirai *et al.*, 1995; Tamaoki *et al.*, 1995).

Josamycin, ein Vertreter 16-gliedriger Makrolide, scheint dagegen unwirksam zu sein (Kawashima *et al.*, 2002).

Das Besondere an der Wirksamkeit von 14- bzw. 15-gliedrigen Makroliden ist, dass einerseits Pseudomonaden nicht zum Wirkspektrum der Makrolide gehören und andererseits die verwendeten Dosierungen unterhalb der wirksamen Dosis für die antibakterielle Wirkung liegen. Die Effektivität dieser Substanzen wird daher nicht den antibiotischen Eigenschaften, sondern vielmehr ihren anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Wirkungen zugeschrieben (Agen *et al.*, 1993).

Viele Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* konzentrierten sich nun auf den Mechanismus, wie Makrolide ihre anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Effekte ausüben (Übersicht bei Rubin und Tamaoki, 2005). Erythromycin beeinflusst die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und reduziert deren Konzentration in der Bronchialflüssigkeit von mit Gram-negativen Bakterien bzw. Lipopolysaccharid behandelten Mäusen (Kadota *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1987). Zudem greift Erythromycin in Zelldifferenzierung und Zellproliferation von Monozyten bzw. Makrophagen ein (Keicho *et al.*, 1994). In der Bronchialflüssigkeit von Patienten mit DPB wurden hohe Konzentrationen an Zytokinen (z.B. IL-1 $\beta$ , IL-8) und Leukotrien B<sub>4</sub> sowie eine erhöhte Anzahl zytotoxischer T-Lymphozyten gefunden, was unter Makrolidtherapie verringert werden konnte (Kawakami *et al.*, 1997; Oda *et al.*, 1995; Sakito *et al.*, 1996). Die übermäßige Mucusproduktion und -sekretion der Bronchialschleimhaut wird von Makroliden dosisabhängig gehemmt (Kaneko *et al.*, 2003; Marom und Goswami, 1991; Shimizu *et al.*, 2003).

Der Erfolg der Makrolidtherapie bei der Behandlung der DPB führte in der Folge zu Studien, diese Substanzklasse auch zur Behandlung anderer chronischer Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale, Chronische Bronchitis oder Zystische Fibrose einzusetzen. Es zeigte sich, dass Makrolide die klinischen Erscheinungsbilder dieser Atemwegserkrankungen verbessern können (Gotfried, 2004; Hoyt und Robbins, 2001; Rubin und Henke, 2004).

Im Fokus des Interesses steht nun die nähere Charakterisierung der physiologischen, zellulären und molekularen Prozesse des Entzündungsgeschehens, die von Makroliden beeinflusst werden.

## 2 Fragestellungen

Makrolid-Antibiotika werden in Ostasien erfolgreich zur Behandlung der diffusen Panbronchiolitis, einer chronischen entzündlichen Atemwegserkrankung, eingesetzt. Es ist bekannt, dass nicht die antibiotischen Eigenschaften sondern vielmehr die anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften dieser Substanzen für den Therapieerfolg verantwortlich sind. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass niedrigdosierte Makrolide, insbesondere Roxithromycin und Clarithromycin, über einen Zeitraum von mehreren Monaten verabreicht, die Anreicherung von Entzündungszellen in der Lunge sowie die Bildung und Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren vermindern. Jedoch wurden kaum Untersuchungen durchgeführt, die die Wirksamkeit einer Akut-Behandlung mit Makroliden im akuten Entzündungsgeschehen belegen. Darüber hinaus ist der genaue molekulare Mechanismus, wie Makrolide ihre anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften ausüben, weitgehend unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die *in vivo* Wirksamkeit einer einmalig verabreichten Einzeldosis von Makrolid-Antibiotika im akuten Lipopolysaccharid-induzierten Entzündungsgeschehen zu untersuchen. Neben dem klassischen Vertreter der Makrolide, dem Roxithromycin, sollte auch die neueste Substanz dieser Antibiotika-Klasse, das Ketolid Telithromycin, auf anti-inflammatorische Eigenschaften geprüft werden. Darüber hinaus sollten *in vitro* Untersuchungen durchgeführt werden, die den möglichen molekularen Wirkmechanismus der anti-inflammatorischen Effekte erklären können.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche anti-inflammatorischen Effekte haben Roxithromycin und Telithromycin im Tiermodell einer akuten Lungenentzündung?
2. Zeigen Roxithromycin und Telithromycin diese Effekte auch in anderen Organen außer der Lunge im Tiermodell einer akuten systemischen Entzündung?
3. Welcher molekulare Wirkmechanismus liegt der anti-inflammatorischen Wirkung der Makrolide auf zellulärer Ebene zugrunde?

# 3 Material

## 3.1 Chemikalien, Reagenzien und Pharmaka

### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Ampicillin	Sigma Aldrich, Steinheim
Aqua ad injctabilia	Braun, Melsungen
Bacto Agar	Difco, Detroit, MI (USA)
Bacto Pepton	Difco, Detroit, MI (USA)
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
CombiMag Transfection Reagent	OZ Biosciences, Marseille (France)
Complete® Mini-Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM Fertigmedium	Pan Biotech, Aidenbach
dNTP-Mix	Promega, Madison, WI (USA)
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid Solution (10 mg/ml)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylendinitrilotetraessigsäure (Titriplex III)	Merck, Darmstadt
ExGen 500 Transfektionsreagenz	Fermentas, St. Leon-Rot
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fugene 6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
Gereinigtes Wasser, Milli-Q	Millipore, Neu-Isenburg
Glycerin 87% (w/v)	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit, MI (USA)

---

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone Kochsalzlösung	Braun, Melsungen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lasana Magermilchpulver	Humana Milchunion, Herford
Lipopolysaccharid Serotyp 0111:B4	Sigma Aldrich, Steinheim
Lipopolysaccharid Serotyp 055:B5	Sigma Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mouse genomic DNA	BD Biosciences, Pharmingen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
5 x Passive Lysis Buffer	Promega, Madison, WI (USA)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phosphatase-Inhibitor- Cocktail II	Calbiochem, San Diego, CA (USA)
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail I	Sigma Aldrich, Steinheim
PolyMag Transfection Reagent	OZ Biosciences, Marseille (France)
Ponceau S Solution	Sigma Aldrich, Steinheim
Protein-Standard	Sigma Aldrich, Steinheim
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, WI (USA)
Röntgen Rapid Entwickler	Adefo Chemie, Nürnberg
RPMI 1640 Fertigmedium	Pan Biotech, Aidenbach
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SeaKem® LE Agarose	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Sevorane® (Sevofluran)	Abott, Wiesbaden
ssniff Alleinfutter für Ratten und Mäuse	ssniff Spezialdiäten, Soest
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol)	USB Corporation, Cleveland, OH (USA)
Trizol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich, Steinheim
Vario Fix Powder	Tetenal Photowerk, Norderstedt

### 3.1.2 Pharmaka und Testsubstanzen

Azithromycin	Pfizer, Karlsruhe
Clarithromycin	Abott, Wiesbaden
Roxithromycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Telithromycin	Aventis Pharma, Frankfurt
Actinomycin D	Sigma Aldrich, Steinheim
PD 98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavon)	Calbiochem, San Diego, CA (USA)
SB 203580 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfonylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazol)	Tocris, Ellisville, MO (USA)
SP 600125 (1,9-Pyrazoloanthron)	Tocris, Ellisville, MO (USA)

### 3.2 Verbrauchsmaterial

Blotting Papier	BioRad, München
EDTA-Monovetten®	Sarstedt, Nümbrecht
Elektroporationsküvetten, diverse Größen	Eppendorf, Hamburg
Gewebekulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> / 75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturplatten (6-well, 24-well, 96-well)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Glaswaren	Schott, Mainz
Hyperfilm ECL	Fluka, Buchs (Schweiz)
Kanülen BD Microlance™	Becton Dickinson, Heidelberg
Kopierfolien	Radex, Rommerskirchen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
LightCycler Kapillaren	Roche Diagnostics, Mannheim
Microcon® Centrifugal Filter Devices	Millipore, Schwalbach
Mikrotestplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulosemembran (Ø 0,45 µm)	BioRad, München
PCR-Gefäße (0,2 ml/ 0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

---

Pipettenspitzen, diverse Größen	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenrörchen 4,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyrolrörchen 4,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
readyGels (7,5 %/ 10 %/ 12 %)	BioRad, München
Reagiergefäße (1,5 ml/ 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Ritips, diverse Größen	Ritter, Schwabmünchen
Serologische Pipetten (5 ml/ 10 ml/ 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht,
Sterile Filterspitzen, diverse Größen	Gilson, Middleton, WI (USA)
Sterile Impfschlingen, 1 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Spritzen BD Discardit™	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenrörchen (15 ml/ 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

### 3.3 Geräte

Analysenwaage	BP 211D	Sartorius, Göttingen
Autoklav	KSG 112	KSG, Olching
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Revco Ultima	Pabisch, München
Cryo Freezing Container	Nalgene®	Nunc, Wiesbaden
Elektroporator	Multiporator®	Eppendorf, Hamburg
ELISA Reader	Sunrise	Tecan, Crailsheim
Gefriertruhe	Privileg 031.342 8	Quelle, Fürth
Geldokumentation	BDA Digital	Biometra, Göttingen
Gelelektrophoreseapparatur	Mini Protean II System	BioRad, München
	Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad, München
Glaswaren	Bechergläser, Flaschen, Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Handdispenser	HandyStep®	Brand, Wertheim
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	Classic C24	New Brunswick
Kühlschrank	FKS 3600	Liebherr, Ochsenhausen
Luminometer	Lumat LB 9507	EG & G Berthold, Bad Wildbad
Magnetische Platte		OZ Biosciences, Marseille

---

Magnetrührer	Ika Combimag RCT	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop	CK-2	Olympus, Hamburg
Narkosegerät	Trajan 808	Drägerwerk AG, Lübeck
Neubauer Zählkammer		Brand, Wertheim
Operationsbesteck	Pinzetten, Scheren, Skalpelle	Martin Medizin-Technik, Tuttlingen
PCR-Gerät	T1-Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	MultiCal® pH 526	WTW, Weilheim
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, diverse Größen	Finnpipette Digital	Thermo, Langenselbold
Pipettierhilfe, motorbetrieben	Accu-jet	Brand, Wertheim
Plattformschüttler	Innova 2000	New Brunswick, Nürtingen
Real-Time PCR System	LightCycler® 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
Schüttelwasserbad	Typ CS 20	MGW Lauda
Spannungsgerät	Power Pac 200	BioRad, München
Sterilbank	Class II Type A/B3	Janke & Kunkel, Staufen
Tiefkühltruhe	ULT 1090-5VUB	Heraeus, Osterode
Ultra Turrax	TP 18-10	Janke & Kunkel, Staufen
Ultraschallgerät	Sonoplus UW 2070	Bandelin, Berlin
UV-Transilluminator	TI 1	Biometra, Göttingen
Vakuum-Station	Vac-Man®	Promega, Madison, WI (USA)
Vortexgerät	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Waage	PL 1200	Mettler-Toledo, Giessen
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Water	Millipore, Schwalbach
Zentrifugen	MegaFuge 1.0R Sorvall Super T 21 Centrifuge 541	Heraeus, Osterode Thermo, Langenselbold Eppendorf, Hamburg

### 3.4 Kits für die Molekularbiologie und Proteinbiochemie

6-keto Prostaglandin F <sub>1α</sub> EIA Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI (USA)
Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	Sigma Aldrich, Steinheim
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Madison, WI (USA)
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Freiburg

Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
FastPlasmid® Mini	Eppendorf, Hamburg
FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
Nitrate/ Nitrite colorimetric Assay Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI (USA)
Prostaglandin E <sub>2</sub> EIA Kit - Monoclonal	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI (USA)
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Madison, WI (USA)
Quantikine® Immunoassay mouse IFN $\gamma$	R&D Systems, Minneapolis, MN (USA)
Quantikine® Immunoassay mouse IL-1 $\beta$	R&D Systems, Minneapolis, MN (USA)
Quantikine® Immunoassay mouse IL-6	R&D Systems, Minneapolis, MN (USA)
Quantikine® Immunoassay mouse TNF $\alpha$	R&D Systems, Minneapolis, MN (USA)
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Madison, WI (USA)

## 3.5 Molekulargewichtsstandards

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Kaleidoscope Prestained Standards	BioRad, München
Precision Plus Protein™ Standards	BioRad, München

## 3.6 Antikörper und Enzyme

### 3.6.1 Antikörper

mouse COX-2 (M-19) Ab	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)
mouse IL-1 $\beta$ (M-20) Ab	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)
mouse NOS-II Ab	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI (USA)
chicken anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)
rabbit anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)
p38 MAPK Ab	Cell Signaling, Beverly, MA (USA)
p44/42 MAPK Ab	Cell Signaling, Beverly, MA (USA)
SAPK/JNK Ab	Cell Signaling, Beverly, MA (USA)

---

Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Ab	Cell Signaling, Beverly, MA (USA)
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Ab	Cell Signaling, Beverly, MA (USA)
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr1854) Ab	Cell Signaling, Beverly, MA (USA)
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Ab	Cell Signaling, Beverly, MA (USA)

### 3.6.2 Enzyme

<i>Bgl</i> II	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>Kpn</i> I	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>Xho</i> I	Amersham Biosciences, Freiburg
T4-DNA Ligase	USB Corporation, Cleveland, OH (USA)
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe

## 3.7 Oligonukleotide und Vektoren

### 3.7.1 Oligonukleotide

#### 3.7.1.1 Reverse Transkription

Oligo(dT) <sub>15</sub> Primer	Promega, Madison, WI (USA)
--------------------------------	----------------------------

#### 3.7.1.2 Primer für die IL-1 $\beta$ -Promotor-Konstrukte

Die Oligonukleotide für die Klonierung verschiedener IL-1 $\beta$ -Promotor-Konstrukte der Maus wurden von der Fa. MWG (Ebersberg) synthetisiert.

---

Konstrukt	Sequenz (5' → 3')	
IL-1 $\beta$ Promotor (870 bp)	Sense	GCA GAT CTG CTC GTG CCT GTA ATC TC
	Antisense	GCA GAT CTA ACC AGG GGA CAG AGA AG
IL-1 $\beta$ Promotor (2700 bp)	Sense	GCC TCG AGT GAG CCT ATT AGG CCT CG
	Antisense	GCG GTA CCG CTC GTG CCT GTA ATC TC

---

Tab. 2: Oligonukleotidsequenzen für IL-1 $\beta$  Promotor-Konstrukte.

### 3.7.1.3 Primer für die quantitative PCR

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Fa. MWG (Ebersberg) synthetisiert.

Gen		Sequenz (5' → 3')	Mg-Konz.	Länge
TNF $\alpha$	sense	CCC GGG CTC AGC CTC TTC TCA TTC	3 mM	201 bp
	antisense	GGA TCC GGT GGT TTG CTA CGA CGT		
IL-1 $\beta$	sense	TCT CGC AGC AGC ACA TCA	3 mM	197 bp
	antisense	CAC ACA CCA GCA GGT TAT		
IL-6	sense	CCG GAG AGG ACA CTT CAC	3 mM	163 bp
	antisense	CTG CAA GTG CAT CAT CGT		
IFN $\gamma$	sense	CAC AGT CAT TGA AAG CCT	5 mM	169 bp
	antisense	AGA CTT CAA AGA CTC TGA		
COX-2	sense	TCC AGT AGC AGA TGA CTG CC	5 mM	298 bp
	antisense	CAA TTT TCC ATC CTT GAA		
NOS-II	sense	GCT TAG AGA ACT CAA CCA C	5 mM	453 bp
	antisense	GCT GCC CTC GAA GGT GAG C		
GAPDH	sense	TTC ATT GAC CTC AAC TAC AT	3 mM	466 bp
	antisense	GAG GGG CCA TCC ACA GTC TT		
$\beta$ -Actin	sense	CCG CCC TAG GCA CCA GGG TG	3 mM	285 bp
	antisense	GGC TGG GGT GTT GAA GGT CTC AAA		

Tab. 3: Oligonukleotidsequenzen für Gene der Maus.

### 3.7.2 Vektoren

pCR® 2.1-TOPO® Vector	Invitrogen, Karlsruhe
pGL3-Enhancer Vector	Promega, Madison, WI (USA)
pRL-Null Vektor	Promega, Madison, WI (USA)

## 3.8 Puffer, Medien und Zubereitungen

### 3.8.1 Puffer und Medien

<b>DEPC-H<sub>2</sub>O</b>	1 ml DEPC ad 1 l gereinigtes Wasser, schütteln und über Nacht stehen lassen, autoklavieren
<b>10 x TBE</b>	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8,0) ad 1000 ml gereinigtes Wasser
<b>1 x TBE</b>	10 x TBE 1:10 mit gereinigtem Wasser verdünnt
<b>10 x PBS</b>	80 g NaCl 2 g KCl 26,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1000 ml gereinigtes Wasser
<b>1 x PBS</b>	10 x PBS 1:10 mit gereinigtem Wasser verdünnt
<b>10 x TBS</b>	121,1 g Tris 58,4 g NaCl 5,1 g MgCl <sub>2</sub> ad 1000 ml gereinigtes Wasser, mit HCl auf pH 7,4
<b>1 x TBS</b>	10 x TBS 1:10 mit gereinigtem Wasser verdünnt
<b>TBS-T</b>	1 x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20
<b>SDS-Lysispuffer</b>	2,5 g SDS 0,3 g Tris ad 250 ml gereinigtes Wasser, mit HCl auf pH 7,4

---

<b>5 x SDS Probenpuffer</b>	10 % (w/v) SDS 5 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 50 % (v/v) Glycerin 0,25 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,05 % (w/v) Bromphenolblau ad 10 ml gereinigtes Wasser
<b>10 x Elektrophorese Puffer</b>	10 g SDS 30,3 g Tris 144,1 g Glycin ad 1000 ml gereinigtes Wasser, mit HCl auf pH 7,5
<b>1 x Elektrophorese Puffer</b>	10 x Elektrophorese Puffer 1:10 mit gereinigtem Wasser verdünnt
<b>1 x TransferPuffer</b>	14 g Glycin 3 g Tris 200 ml Methanol ad 1000 ml gereinigtes Wasser
<b>Blockier-Puffer</b>	TBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver
<b>LB-/LB<sub>AMP</sub>-Medium</b>	10 g/l NaCl 10 g/l Bacto-Pepton 5 g/l Hefeextrakt für LB <sub>AMP</sub> -Medium zusätzlich 100 $\mu$ g/ml Ampicillin
<b>LB-/LB<sub>AMP</sub>-Agarplatten</b>	10 g/l NaCl 10 g/l Bacto-Pepton 5 g/l Hefeextrakt 20 g/l Agar für LB <sub>AMP</sub> -Medium zusätzlich 100 $\mu$ g/ml Ampicillin

---

<b>SOC-Medium</b>	20 g Bacto-Pepton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 ml 1 M KCl in 900 ml gereinigtem Wasser lösen mit 10 M NaOH auf pH 7,0 einstellen und mit gereinigtem Wasser zu 970 ml ergänzen, autoklavieren 10 ml sterile 1 M MgCl <sub>2</sub> -Lösung und 20 ml sterile 1 M Glucose-Lösung hinzufügen
-------------------	--

### 3.8.2 Zubereitungen der Testsubstanzen zur Applikation in vivo

LPS (Serotyp 0111:B4)	Lösung von 10 mg LPS (Serotyp 0111:B4) in 1660 µl steriler isotoner Kochsalzlösung zur intraperitonealen Applikation
LPS (Serotyp 055:B5)	Lösung von 10 mg LPS (Serotyp 055:B5) in 1660 µl steriler isotoner Kochsalzlösung zur nasalen Applikation
Roxithromycin	Suspension von 6,7 mg Roxithromycin in 1 ml steriler isotoner Kochsalzlösung zur intraperitonealen Applikation
Telithromycin	Suspension von 20 mg Telithromycin in 1 ml steriler isotoner Kochsalzlösung zur intraperitonealen Applikation

### 3.8.3 Lösungen der Testsubstanzen für die Zellversuche

LPS (Serotyp 0111:B4)	Stammlösung [10 mg/ml] in gereinigtem sterilen Wasser
Roxithromycin	Stammlösung [100 mg/ml] in DMSO
Telithromycin	Stammlösung [100 mg/ml] in DMSO
Azithromycin	Stammlösung [100 mg/ml] in DMSO
Clarithromycin	Stammlösung [100 mg/ml] in DMSO
SB 203580	Stammlösung [10 mg/ml] in DMSO
SP 600125	Stammlösung [5 mg/ml] in DMSO
PD 98059	Stammlösung [5 mg/ml] in DMSO
Actinomycin D	Stammlösung [5 mg/ml] in DMSO

## 3.9 Bakterien und Zelllinien

JM 109 Competent Cells	Promega, Madison, WI (USA)
J-774A.1 Makrophagen	DSMZ, Braunschweig
J-774R Makrophagen	Dr. Klaus Ruckdeschel, Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und Mikrobiologie, München

## 3.10 Versuchstiere

CD-1® Maus	Charles River, Sulzfeld
------------	-------------------------

# 4 Methoden

## 4.1 Tiere

Alle Tierversuche wurden von der Regierung der Oberpfalz genehmigt und gemäß den geltenden Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

### 4.1.1 Tierhaltung

Für die Tierversuche wurden männliche CD-1®-Mäuse verwendet. Die Haltung erfolgte in Gruppen von 5 - 8 Tieren pro Käfig. Alle Tiere erhielten Standardfutter und Leitungswasser *ad libitum*. Das Streumaterial wurde zweimal wöchentlich erneuert. Die Bedingungen im Tierstall wurden auf folgende, für Nager optimale Parameter eingestellt:

- Temperatur:  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Relative Luftfeuchtigkeit:  $55\text{ \%} \pm 5\text{ \%}$
- Hell-Dunkel-Intervall: 12 h

Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere über einen Zeitraum von 5 Tagen an die lokalen Bedingungen adaptiert.

### 4.1.2 Induktion einer akuten systemischen Entzündungsreaktion durch intraperitoneale Applikation von Lipopolysaccharid

Die Mäuse wurden gewogen und in Gruppen zu je 5 Tieren unterteilt. Zur Induktion einer systemischen Entzündungsreaktion wurde den Tieren 1 mg/kg Lipopolysaccharid (Serotyp 0111:B4) intraperitoneal in einem Volumen von 0,5 ml injiziert. Tiere der Kontrollgruppen erhielten physiologische Kochsalzlösung. Die Applikation erfolgte unter vorangegangener Inhalationsnarkose mit Sevofluran.

Den Mäusen der einzelnen Wirkstoffgruppen wurde 2 Stunden vor der LPS-Injektion der jeweilige Wirkstoff in suspendierter Form intraperitoneal in einem Volumen von 0,25 ml verabreicht. Die Dosis betrug bei Roxithromycin 50 mg/kg und bei Telithromycin 150 mg/kg.

Die Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung. Die Injektion wurde ebenfalls unter Inhalationsnarkose mit Sevofluran durchgeführt.

Während der Versuchsphase wurde der körperliche Zustand der Tiere regelmäßig überwacht. Die Tötung der Mäuse erfolgte 1, 2 und 6 Stunden nach der LPS-Injektion durch Dekapitation unter Inhalationsnarkose mit Sevofluran. Das dabei erhaltene Vollblut wurde in K-EDTA-Monovetten aufgefangen und für 10 min bei 4000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Körper der Mäuse wurde geöffnet und Herz, Lunge, Niere, Leber und Milz entnommen. Zur Säuberung von Blut und Geweberesten wurden die Organe sorgfältig mit isotoner Kochsalzlösung abgespült, anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei -70 °C aufbewahrt.

#### **4.1.3 Modell einer akuten Lungenentzündung durch nasale Applikation von Lipopolysaccharid**

Die Mäuse wurden gewogen und in Gruppen zu je 5 Tieren unterteilt. Zur Induktion einer akuten Lungenentzündung wurde den Tieren 1 mg/kg Lipopolysaccharid (Serotyp 055:B5) nasal wie folgt verabreicht. Die Mäuse wurden narkotisiert und auf den Rücken gelegt, um ungehinderten Zugang zur Schnauze zu haben. Anschließend wurden in jedes Nasenloch 25 µl der LPS-Lösung geträufelt, welche durch die normalen Atemzüge der Tiere in die Lunge weitertransportiert wurden. Die Tiere der Kontrollgruppen erhielten physiologische Kochsalzlösung.

Analog zum Modell der systemischen Entzündung wurde den Mäusen der einzelnen Wirkstoffgruppen 2 Stunden vor der LPS-Applikation entweder 50 mg/kg Roxithromycin oder 150 mg/kg Telithromycin intraperitoneal verabreicht.

Während der Versuchsphase wurde der körperliche Zustand der Tiere regelmäßig überwacht. Die Tötung der Mäuse erfolgte 3 und 6 Stunden nach der LPS-Injektion durch Dekapitation unter Inhalationsnarkose mit Sevofluran. Das erhaltene Vollblut wurde in K-EDTA-Monovetten aufgefangen und für 10 min bei 4000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Körper der Mäuse wurde geöffnet und deren Lunge entnommen. Zur Säuberung von Blut und Geweberesten wurden die Lungen sorgfältig mit isotoner Kochsalzlösung abgespült, anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei -70 °C aufbewahrt.

## 4.2 Bakterienkultur

### 4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Für alle molekularbiologischen Arbeiten wurden *E. coli* vom Typ JM 109 verwendet. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Luria-Bertani-(LB)-Medium bzw. auf LB-Agarplatten bei 37 °C. Bei Plasmid tragenden *E. coli* Stämmen – alle verwendeten Plasmide tragen die Information für eine Ampicillinresistenz – wurde zur Selektion Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt. Für das Anlegen von Dauerkulturen wurden eine logarithmisch wachsende *E. coli* Kultur im Verhältnis 1:3 mit Glycerin gemischt und in Aliquots von 500 µl bei -80 °C gelagert.

### 4.2.2 Transformation von *E. coli*

Etwa 50 - 100 µl einer auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* Suspension (Fa. Promega) wurden mit 50 - 100 ng Plasmid-DNA versetzt und durch vorsichtiges Pipettieren gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein 1-minütiger Hitzeschock auf exakt 42 °C im Heizblock, um die Aufnahme der DNA zu stimulieren. Danach wurden die Bakterien sofort wieder für einige Minuten auf Eis gestellt, mit 400 µl SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C und 200 U/min geschüttelt, um die Ausbildung der auf der Plasmid-DNA codierten Ampicillinresistenz zu ermöglichen. 100 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf LB<sub>AMP</sub>-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnten dann einzelne Kolonien gepickt und in LB<sub>AMP</sub>-Flüssigmedium in größeren Mengen angezogen werden.

## 4.3 Arbeiten mit Zellkulturen

### 4.3.1 Zellkulturbedingungen

Bei den Zelllinien J-774A.1 und J-774R handelt es sich um adhärent wachsende murine Makrophagen, die aus Balb/c-Mäusen gewonnen wurden (Ralph *et al.*, 1976). Die Kultivierung erfolgte für J-774A.1 in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) bzw. für J-774R in RPMI 1640 (benannt nach seinem Entwicklungsort im Roswell Park Memorial Institute) jeweils unter Zusatz von 10 % (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml

Streptomycin in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> im Inkubator. Alle 2 - 3 Tage wurde das Medium gewechselt. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 90 % wurden die Makrophagen durch vorsichtiges Ablösen mit dem Zellschaber im Verhältnis 1:4 - 1:6 passagiert.

Von jeder Zelllinie wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen nach dem Abschaben mittels Zentrifugation bei 1000 U/min pelletiert und in einer Konzentration von 1 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml in Zellkulturmedium mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots von 1 ml in Kryoröhrchen gefüllt, langsam (1 °C/min) in einem mit Isopropanol befüllten Kryogefäß auf -70 °C abgekühlt und nach einigen Tagen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **4.3.2 Stimulation der Zellen mit LPS**

Zur Durchführung der einzelnen Versuche wurden die Zellen je nach Versuchsvorhaben in 24-well Platten, 6-well Platten, 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät und unter den in Kap. 4.3.1 genannten Standardbedingungen bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90 % kultiviert. Am Vorabend des Versuchstags wurde das alte Medium entfernt und durch frisches Penicillin- und Streptomycin-freies Medium ersetzt, welches nur 0,5 % (v/v) FCS enthielt; die Makrophagen verfallen so in einen Wachstumsstop und sprechen besser auf eine Stimulation mit LPS an. Auch während des Versuchs wurde dieses Entzugsmedium verwendet. Auf Penicillin und Streptomycin wurde verzichtet, da die Wirkung von Makroliden bzw. Ketoliden unbeeinflusst von anderen Antibiotika untersucht werden sollte.

Durch Zugabe von LPS zum Zellkulturmedium wurden die Zellen zur Bildung diverser Entzündungsmediatoren angeregt. Alle verwendeten Testsubstanzen wurden mit einem zeitlichen Vorlauf von 30 - 60 min appliziert. Nach einer Inkubationszeit mit LPS von 3 - 24 h wurde das Medium abgenommen und Aliquots von 1 ml in 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in geeignetem Lysis-Reagenz in Abhängigkeit von der gewünschten nachfolgenden Probenaufbereitung abgeschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden unmittelbar weiterverarbeitet oder konnten bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert werden.

#### **4.3.3 Transfektion**

Um den Einfluss von Schwankungen in der Transfektionseffizienz und der Zellzahl auf das Ergebnis zu vermindern erfolgte stets ein Kotransfektion des pGL3-IL-1β-Promotor-Konstrukts, welches die Luziferase des Leuchtkäfers (*Firefly, Photinus pyralis*) codiert, mit

einem Kontrollplasmid, welches die Luziferase von *Renilla (Renilla reniformis)*, einer Korallenart, codiert. Sofern nicht anders angegeben wurde pro well insgesamt 1 µg DNA eingesetzt, bestehend aus 0,9 µg pGL3-IL-1 $\beta$ -Promotor-Konstrukt und 0,1 µg pRL-Null-Vektor.

#### 4.3.3.1 Transfektion mit ExGen 500

Zur Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro well einer 24-well Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. 1 µg Plasmid-DNA wurde in 100 µl isotoner Kochsalzlösung verdünnt, mit 4 µl ExGen 500 (Fa. Fermentas) versetzt und sofort für 10 s heftig gevortext. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur von 10 min wurden 100 µl dieser Mischung mit 900 µl Zellkulturmedium gemischt und auf die vorher mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Anschließend konnten Wirkstoffapplikation und LPS-Stimulation über den gewünschten Zeitraum durchgeführt werden.

#### 4.3.3.2 Transfektion mit Fugene 6

Zur Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro well einer 24-well Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. 1 µg Plasmid-DNA wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. In einem weiteren 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde das Transfektionsreagenz Fugene 6 (Fa. Roche) im Verhältnis Fugene 6 zu DNA von 3:2, 3:1 bzw. 6:1 (µl zu µg) in serumfreiem Medium ad 100 µl verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die DNA-Lösung zur Fugene 6-Lösung pipettiert und die Mischung für 15 min bei RT inkubiert. 100 µl dieses Ansatzes wurden mit 500 µl Zellkulturmedium gemischt und auf die vorher mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Anschließend konnten Wirkstoffapplikation und LPS-Stimulation über den gewünschten Zeitraum durchgeführt werden.

#### 4.3.3.3 Transfektion mittels Elektroporation

Zur Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA mittels Elektroporation wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase in Medium abgeschabt und durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000U/min und RT pelletiert.  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml hypo- oder isoosmolarem Elektroporationspuffer (Fa. Eppendorf) resuspendiert und mit 25 µg Gesamt-DNA (9 Teile pGL3-IL-1 $\beta$ -Promotor-Konstrukt und 1 Teil pRL-Null-Vektor)

gemischt. 100 µl bis 800 µl Suspension wurden in die Elektroporationsküvetten überführt und diese in den Multiporator (Fa. Eppendorf) eingesetzt. Es folgte die Elektroporation mit 100 - 600 V für 40 - 100 µs. Nach dem Puls wurde die Suspension noch für 5 - 10 min bei RT in der Küvette stehengelassen, bevor sie in frischem Vollmedium aufgenommen und auf 6-well Platten verteilt wurde. Die Zellen wurden für 12 - 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. Danach konnten Wirkstoffapplikation und LPS-Stimulation über den gewünschten Zeitraum durchgeführt werden.

#### 4.3.3.4 Transfektion mittels Magnetofektion

Die Magnetofektion ist eine neue Methode zur effizienten Transfektion schwer transfizierbarer Zelllinien. Es wurden die Reagenzien PolyMag und CombiMag der Fa. OZ Biosciences verwendet. Dabei handelt es sich um magnetische Nanopartikel, die mit kationischen Molekülen beschichtet sind. Die Methode basiert auf der Vereinigung der DNA mit diesen Nanopartikeln zu molekularen Komplexen, die mittels eines magnetischen Felds direkt in die Zellen transportiert werden.

Zur Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA wurden  $1 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Zellen pro well einer Mikrotestplatte ausgesät und über Nacht inkubiert. Pro well wurden 0,1 - 0,5 µg Gesamt-DNA (9 Teile pGL3-IL-1β-Promotor-Konstrukt und 1 Teil pRL-Null-Vektor) zugefügt.

Im Fall der Magnetofektion mit PolyMag wurde die DNA in serum- und antibiotikafreiem Medium verdünnt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem 2 - 4 µl PolyMag vorgelegt wurden. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei RT, damit sich die molekularen Komplexe bilden konnten. Im Fall der Magnetofektion mit CombiMag wurde die DNA in serum- und antibiotikafreiem Medium (Fugene 6) bzw. isotoner Kochsalzlösung (ExGen 500) verdünnt, mit Fugene 6 bzw. ExGen 500 in verschiedenen Verhältnissen gemischt und zur Ausbildung der Komplexe für 15 min bei RT inkubiert. Die Mischung wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, in dem 2 - 4 µl ComiMag vorgelegt wurden, überführt und anschließend für weitere 15 min bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation zur Bildung der magnetischen Komplexe wurden diese auf die Zellen gegeben. Die Mikrotestplatte wurde anschließend für 20 - 30 min auf die magnetische Platte gesetzt. Nach der Magnetofektion wurden die Zellen für 12 - 72 h unter Standardbedingungen (s. Kap. 4.3.1) inkubiert. Danach konnten Wirkstoffapplikation und LPS-Stimulation über den gewünschten Zeitraum durchgeführt werden.

#### 4.3.4 Reportergen-Assay

Die Untersuchungen der von den transfizierten Zellen exprimierten Luziferase wurden mit dem Dual Luciferase Reporter Assay System der Fa. Promega durchgeführt. Dabei wird die Eigenschaft der Firefly- und Renilla-Luziferase genutzt, in von ihnen katalysierten Reaktionen mit speziellen Substraten Lichtemissionen zu erzeugen, welche mit dem Luminometer gemessen werden können.

Die mit dem pGL3-IL-1 $\beta$ -Promotor-Konstrukt und dem pRL-Null-Vektor transfizierten Zellen wurden mit den Wirkstoffen inkubiert und über den gewünschten Zeitraum mit LPS stimuliert. Um Mediumreste abzutrennen, wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 100  $\mu$ l Passive Lysis Buffer für 15 min bei 150 U/min und RT auf dem Schüttler lysiert. 20  $\mu$ l Lysat wurden in 4,5 ml Messrörchen pipettiert. Die Messung erfolgte am Luminometer in zwei Schritten; im ersten Schritt wird durch Zugabe von 100  $\mu$ l Luziferase Assay Substratlösung (Reagenz I) die Firefly-Lumineszenz und anschließend im zweiten Schritt durch Zugabe von 100  $\mu$ l Stop & Glo Lösung (Reagenz II) die Renilla-Lumineszenz gemessen. Die relative Luziferaseaktivität erlaubt Aussagen über die transkriptionelle Aktivität des IL-1 $\beta$ -Promotors.

### 4.4 Arbeiten mit RNA

#### 4.4.1 Vorkehrungen bei Arbeiten mit RNA

Da RNA im Vergleich zu DNA chemisch instabil und sehr anfällig für den enzymatischen Abbau durch ubiquitär vorkommende RNasen ist, sind besondere Vorkehrungen beim Arbeiten mit RNA zu treffen.

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden bei allen Arbeiten stets Handschuhe getragen; es wurde grundsätzlich sterile und RNase-freie Glas- und Plastikware sowie mit DEPC behandeltes Wasser verwendet. Die Arbeiten mit RNA wurden, sofern nicht anders angegeben, auf Eis ausgeführt.

#### 4.4.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellkulturen und Geweben wurde Trizol-Reagent<sup>®</sup> der Fa. Invitrogen verwendet. Es handelt sich um eine einphasige, Phenol und

Guanidinithiocyanat enthaltende Flüssigkeit und basiert auf der von Chomczynski und Sacchi entwickelten Methode der RNA-Isolierung (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Zur Auswertung der Tierversuche wurde das gefrorene Gewebe (je nach Organ ca. 100 - 200 mg) in 2 ml Trizol mit dem Ultraturrax homogenisiert, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C gelagert. Für die *in vitro* Untersuchungen wurden die Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen angezogen und über den gewünschten Zeitraum mit LPS stimuliert. Danach wurden sie in 1 ml Trizol abgeschabt, 10 s mit dem Sonifier homogenisiert, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C gelagert.

Nach dem Auftauen der homogenisierten Proben wurden 200 µl Chloroform pro ml Trizol zugegeben, die Proben für 15 s heftig im Ständer geschüttelt und für 3 min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation bei 6000 U/min für 15 min bei 4 °C erfolgte eine Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol pro ml Trizol gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT zum Ausfällen der RNA wurde 10 min bei 6000 U/min und 4 °C zentrifugiert, um die RNA zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Ethanol 70 % (v/v) pro ml Trizol gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4000 U/min und 4 °C konnte der Überstand wieder verworfen und das Pellet für 5 - 10 min an der Luft getrocknet werden. In Abhängigkeit von der Größe des Pellets wurde die RNA in 100 - 1000 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Nach ihrer Konzentrationsbestimmung konnte die RNA bei -70 °C gelagert werden.

#### 4.4.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Ausbeute an Gesamt-RNA wurde durch Messung der optischen Dichte photometrisch bei 260 nm bestimmt. Dabei wurden die Proben 1:40 in DEPC-Wasser verdünnt. Es gilt folgender Zusammenhang:

OD<sub>260nm</sub> = 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml RNA

Die Reinheit der RNA kann anhand der Ratio der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Es wurde ausschließlich RNA mit einer Ratio<sub>260/280</sub> von 1,5 - 2,0 weiterverwendet.

#### 4.4.4 Reverse Transkription

Zur Synthese von cDNA aus RNA wurde eine reverse Transkriptase-Reaktion unter Verwendung der M-MLV Reverse Transkriptase und des mitgelieferten 5 x Reaktionspuffer der Fa. Promega durchgeführt. Dazu wurden 2 µg RNA ad 9 µl DEPC-Wasser in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 1 µl Oligo(dT)<sub>15</sub> Primer gemischt. Diese Mischung wurde für 5 min auf 65 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Dem Reaktionsgemisch wurden pro Probe zusätzlich 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM), 0,5 µl RNasin, 1 µl Reverse Transkriptase, 2,5 µl DEPC-Wasser und 4 µl 5 x Reaktionspuffer zugefügt. Nach Mischen erfolgte die cDNA-Synthese im Thermocycler bei 37 °C für 1 h mit anschließender Inaktivierung der Enzyme durch 2-minütiges Erhitzen auf 95 °C. Die cDNA konnte nun bei -20 °C aufbewahrt werden.

### 4.5 Arbeiten mit DNA

#### 4.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

##### 4.5.1.1 Mini Prep

Die Präparation der Plasmide aus *E. coli* im Mini-Ansatz erfolgte mit Hilfe des FastPlasmid Mini Kits der Fa. Eppendorf. Für die Mini Prep wurden 3 ml LB<sub>AMP</sub>-Flüssigmedium mit einer frisch isolierten Kolonie von der Agarplatte in 15 ml Röhrchen angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschüttler geschüttelt. Die Hälfte der Bakteriensuspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation für 2 min bei 12000 U/min und RT pelletiert; der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 400 µl eiskalter Complete Lysis Solution wurde für 30 s heftig gevortext und für 3 min auf RT inkubiert. Das Bakterienlysat wurde danach auf die Säule überführt, welche bei 12000 U/min für 45 s bei RT zentrifugiert wurde; die DNA wurde dabei an das Säulenmaterial gebunden, das Zentrifugat hingegen konnte verworfen werden. Die gebundene DNA wurde durch Zugabe von 400 µl Wash Buffer und erneute Zentrifugation gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 µl Elution Buffer durch Zentrifugation bei 12000 U/min für 45 s bei RT. Die Konzentration der eluierten DNA wurde photometrisch bestimmt; danach konnte diese bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

#### 4.5.1.2 Maxi Prep

Die Präparation der Plasmide aus *E. coli* im Maxi-Ansatz erfolgte mit Hilfe des PureYield Plasmid Midiprep System der Fa. Promega. Für die Maxi Prep wurden 100 - 150 ml LB<sub>AMP</sub>-Flüssigmedium mit einer frisch von der Agarplatte isolierten Kolonie oder 10 ml Bakteriensuspension aus der Mini Prep im Erlenmeyerkolben angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschüttler geschüttelt. Alle Arbeitsschritte der Plasmid-Präparation wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Bakterien wurden in 50 ml Röhrchen mittels Zentrifugation bei 6000 U/min für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 3 ml Cell Resuspension Solution durch Pipettieren resuspendiert. Nach Zugabe von 3 ml Cell Lysis Solution wurde die Suspension durch mehrmaliges vorsichtiges Invertieren des Röhrchens gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml Neutralization Solution zum Lysat wurde wiederum vorsichtig durch mehrmaliges Invertieren gemischt und nochmals für 3 min bei RT inkubiert. Der entstehende Niederschlag wurde durch Zentrifugation bei 10000 U/min für 10 min abgetrennt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Vakuum. Dazu wurde die blaue Clearing Column auf die weiße Binding Column und diese Säulenkombination auf die Vakuum-Station gesteckt. Das zentrifugierte Lysat wurde auf die Säulenkombination pipettiert und nach Anlegen des Vakuums durch beide Säulen gesaugt. Die DNA wurde dabei an die Binding Column gebunden, so dass die Clearing Column verworfen werden konnte. Es folgten zwei separate Waschschritte mit 5 ml Endotoxin Removal Wash Solution bzw. 20 ml Column Wash Solution. Die Binding Column wurde von der Vakuum-Station abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 600 µl Nuclease-Free Water auf die Membran der Säule wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend die DNA mittels Zentrifugieren bei 2000 U/min für 5 min von der Säule eluiert. Die erhaltene DNA konnte nach ihrer Konzentrationsbestimmung bei -20 °C aufbewahrt werden.

#### 4.5.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte photometrisch bei 260 nm bestimmt. Dabei wurden die Proben 1:20 in DEPC-Wasser verdünnt. Es gilt folgender Zusammenhang:

OD<sub>260nm</sub> = 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml DNA

Die Reinheit der DNA kann anhand der Ratio der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Es wurde nur DNA mit einer Ratio<sub>260/280</sub> von 1,7 - 2,0 weiterverwendet.

### 4.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge wurde in Agarosegelen durchgeführt, wobei die Agarosekonzentration je nach Länge der DNA 1 - 2 % (w/v) betrug. Die Agarose wurde nach Zugabe von 100 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, mit 4 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in die Gelapparatur gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 5 x Loading Dye im Verhältnis 5:1 in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gemischt in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert und durch Anlegen einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Zur Identifizierung der Länge des Fragments wurde ein geeigneter DNA-Molekulargewichtsstandard (Fa. Fermentas) mitgeführt. Die DNA-Fragmente wurden durch Interkalierung mit dem im Gel enthaltenen Ethidiumbromid auf einem UV-Transilluminator bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm sichtbar und mit dem Gel-Dokumentations-System photographiert und analysiert.

### 4.5.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

Für die präparative Gelelektrophorese bzw. zur Aufreinigung von PCR-Produkten mit anschließender Isolation der DNA aus dem Gel wurden Agarosegele der Konzentration 1 % (w/v) verwendet. Die Elektrophorese wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Um Strangbrüche der DNA zu vermeiden, wurde zur Präparation der DNA aus dem Gel längerwelliges UV-Licht (366 nm) verwendet. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit einem sauberer Skalpell ausgeschnitten und in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der DNA wurde standardmäßig mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System der Fa. Promega durchgeführt. Pro 10 mg Gel wurden 10 µl Membrane Binding Solution zugegeben und der Ansatz bei 60 °C aufgeschmolzen. Die Lösung wurde auf die Säule pipettiert und für 1 min bei 14000 U/min und RT zentrifugiert; dabei wurde die DNA an die Membran der Säule gebunden. Es folgten 2 Waschschritte mit jeweils 400 µl Membrane Wash Solution und anschließende Elution der DNA in 50 µl Nuclease-Free Water. Nach der Bestimmung ihrer Konzentration wurde die DNA bei -20 °C aufbewahrt.

## 4.5.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 4.5.5.1 PCR zur Klonierung der IL-1 $\beta$ -Promotor-Konstrukte

Um die Lesegenauigkeit und die Prozessivität in der PCR zu steigern, wurde zur Herstellung der IL-1 $\beta$ -Promotor-Konstrukte das Expand Long Template PCR System der Fa. Roche verwendet. Es beinhaltet neben einer thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase auch eine thermostabile *Tgo*-DNA-Polymerase mit Proofreading-Aktivität. Zur Amplifizierung des 870 bp langen Promotor-Fragments wurde ein Primerpaar mit terminalen Sequenzen für die Endonuklease *Bgl* II verwendet, für die Amplifizierung des 2,7 kb großen Promotor-Konstrukts wurde ein Primerpaar mit einer terminalen Sequenzen für *Kpn* I einerseits und *Xho* I andererseits verwendet. Die Reaktion wurde im Thermocycler in einem Volumen von 50  $\mu$ l unter Einsatz von genomischer DNA der Maus als Template durchgeführt. 50 ng genomicsche DNA wurden mit 5 U Enzym-Mix und 5  $\mu$ l PCR-Puffer Nr. 1 sowie 5  $\mu$ l dNTP-Mix (je 2,5 mM) und je 3  $\mu$ l des sense und antisense Primers (je 10 pmol) in einem sterilen 0,2 ml PCR-Gefäß gemischt und mit steriles Wasser zu einem Volumen von 50  $\mu$ l ergänzt. Das Protokoll bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt von 2 min bei 94 °C gefolgt von 35 Zyklen bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 94 °C, einer Annealingphase von 30 s bei 60 °C und einer Elongationsphase von 1 min bei 68 °C. Danach wurde eine 7-minütige finale Elongation bei 68 °C durchgeführt und der Ansatz anschließend auf 4 °C gekühlt. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelektrophorese analysiert und gereinigt.

### 4.5.5.2 Realtime-PCR mit dem LightCycler-System von Roche

Die quantitative PCR wurde mit dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit der Fa. Roche durchgeführt. Die Proben wurden in einem Gesamtvolume von 20  $\mu$ l in LightCycler-Kapillaren angesetzt. Der Ansatz enthielt 2  $\mu$ l cDNA aus der reversen Transkription, 2  $\mu$ l des Master-Mixes, je 1  $\mu$ l sense und antisense Primer (je 10 pmol/ $\mu$ l) sowie in Abhängigkeit der verwendeten Primer 3 mM oder 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Die Proben wurden vorsichtig in die Glaskapillaren zentrifugiert und diese in das LightCycler-Karussell gesteckt. Das Amplifikationsprotokoll bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt von 10 min bei 95 °C gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus einer Denaturierungsphase von 10 s bei 95 °C, einer Annealingphase von 7 s bei 58 °C und einer Elongationsphase von 18 s bei 72 °C. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase. Nach Beenden der Amplifikation wurde das Schmelzverhalten der DNA analysiert, um die

Richtigkeit des amplifizierten PCR-Produkts zu überprüfen. Dazu wurde die DNA langsam (0,1 °C/min) von 58 °C auf 95 °C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Um die Spezifität der PCR-Reaktion zu verfolgen, wurde in jedem Lauf eine Negativ-Kontrolle mit sterilem Wasser anstelle der cDNA mitgeführt. Zur zusätzlichen Kontrolle der Richtigkeit der amplifizierten DNA wurden von jedem Lauf Proben aufgehoben und die PCR-Produkte mittels Agarosegelektrophorese analysiert.

## 4.5.6 DNA-Modifikationen

### 4.5.6.1 Klonierung von PCR-Produkten in einen TOPO® Vektor

Das TOPO TA Cloning® Kit der Fa. Invitrogen ermöglicht ein schnelles und effektives Einführen von mit *Taq* Polymerase amplifizierten PCR-Produkten in einen Plasmid-Vektor. Mit Hilfe einer kovalent am Vektor gebundenen Topoisomerase I kommt es zur Ligation überhängender Desoxyadenosin-Reste am 3'-Ende des PCR-Produkts mit den überhängenden 3'-Desoxythymidin-Resten des Vektors.

4 µl frisches PCR-Produkt wurden mit 1 µl TOPO® Vektor und 1 µl Salt Solution in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Eis gestellt und. Es folgte die Transformation von 2 µl des Ansatzes in *E. coli*.

### 4.5.6.2 Restriktionsverdau

Es wurden die Restriktionsendonucleasen *Bgl* II, *Kpn* I und *Xho* I der Fa. Amersham verwendet. Der Verdau wurde typischerweise in einem Volumen von 50 µl mit ca. 10 µg DNA (zirkulärer Vektor bzw. gereinigte PCR-Produkte und DNA-Fragmente) unter Verwendung von 30 U des jeweiligen Enzyms und dessen optimalen Puffers in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis angesetzt. Der Ansatz wurde 2 - 3 h bei 37 °C inkubiert. Die verdauten Fragmente wurden mittels Agarose-Gelektrophorese analysiert und gereinigt.

### 4.5.6.3 Dephosphorylierung

Um eine Ligation des pGL3-Enhancer-Vektors mit sich selbst zu vermeiden, wurde dieser nach dem Restriktionsverdau mit der Calf-Intestine-Alkaline-Phosphatase (CIAP) der Fa. Fermentas inkubiert. Dieses Enzym entfernt die Phosphatgruppen der 5'-Enden des linearisierten Plasmids. Dazu wurden 50 µl des Verdaus mit 1 U CIAP und dem entsprechenden Reaktionspuffer im 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem der Ansatz für 15 min auf 85 °C erhitzt wurde.

Nach der Bestimmung der DNA-Konzentration konnte der Ansatz für eine Ligation mit DNA-Fragmenten verwendet werden.

#### 4.5.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen mit dem pGL3-Enhancer-Vektor wurden unter Einsatz von 1 U T4-DNA-Ligase und des entsprechenden Ligationspuffers der Fa. USB in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, wobei das DNA-Insert in einem molaren Verhältnis von 2:1 zum linearisierten Plasmid eingesetzt wurde. Standardmäßig wurden 50 - 100 ng Plasmid verwendet. Die Berechnung der Menge an Insert ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Größe des Inserts [kb]}}{\text{Größe des Vektors [kb]}} \times \text{molares Verhältnis von} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}}$$

Der Ansatz wurde unter Eiskühlung in 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 16 h bei 16 °C inkubiert; im Anschluss daran konnten 50 - 100 ng des Ansatzes in *E. coli* transformiert werden.

#### 4.5.7 DNA-Sequenzanalyse

Die Richtigkeit und Vollständigkeit der generierten pGL3-(IL-1β-Promotor)-Plasmide wurde mittels DNA-Sequenzanalyse überprüft. Die Sequenzierungen wurden von der Fa. SequiServe (Vaterstetten) durchgeführt.

### 4.6 Arbeiten mit Proteinen

#### 4.6.1 Isolierung von Proteinen

##### 4.6.1.1 Gesamtproteinextrakt aus Zellkulturen und Geweben

Zur Isolierung der Gesamtproteine aus Zellkulturen und Geweben wurde, sofern nicht anders angegeben, der SDS-Lysispuffer verwendet. Um eine Degradation der Proteine zu vermeiden wurden dem Lysispuffer Protease-Inhibitoren (Fa. Roche) zugesetzt und sämtliche Arbeiten auf Eis durchgeführt.

Zur Aufbereitung der Organe wurde das gefrorene Gewebe (je nach Organ 50 – 100 mg) in 4,5 ml Röhrchen eingewogen und mit der 5-fachen Menge eiskaltem Lysispuffer zuerst mit

dem Ultraturrax und dann mit dem Sonifier homogenisiert, für 10 min bei 6000 U/min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in 1,5 ml Reaktionsgefäße dekantiert.

Für die Zellversuche wurden die Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen angezogen und über den gewünschten Zeitraum mit LPS stimuliert. Um die Zellen von Mediumresten zu befreien, wurden sie mit kaltem PBS gewaschen, danach in 250 µl eiskaltem Lysispuffer abgeschabt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 s mit dem Sonifier homogenisiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10000 U/min und 4 °C wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße dekantiert.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proteinextrakte konnten bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C gelagert werden.

#### 4.6.1.2 Isolierung von Phosphoproteinen

Zur Isolierung phosphorylierter Proteine wurde der Passive Lysis Buffer der Fa. Promega verwendet. Um den phosphorylierten Status der Proteine zu erhalten, wurden dem Lysispuffer neben Protease-Inhibitoren (Fa. Roche) auch Phosphatase-Inhibitor-Cocktails (Fa. Sigma und Calbiochem) zugesetzt.

Die Zellen wurden in 6-well Platten angezogen und über den gewünschten Zeitraum mit LPS stimuliert. Um Mediumreste abzutrennen, wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl Lysispuffer für 15 min bei 150 U/min und RT auf dem Schüttler passiv lysiert. Das Lysat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und auf Eis gestellt. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 12000 U/min und 4 °C wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße dekantiert. Nach der Proteinbestimmung konnten die Proteinextrakte bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C gelagert werden.

#### 4.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde kolorimetrisch mit dem Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA-Assay) der Fa. Sigma bestimmt. Hierbei wird die Eigenschaft der Proteine genutzt, Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu komplexieren, welche reduziert werden und mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden.

Die Proteinextrakte wurden 1:5 - 1:10 (Zellextrakt) bzw. 1:50 (Gewebeextrakt) im jeweiligen Lysispuffer verdünnt; des Weiteren wurde mit dem Protein-Standard (Fa. Sigma) eine Standardreihe von 0 - 1000 µg BSA hergestellt. Je 25 µl Standard bzw. Probe wurden in eine Mikrotestplatte pipettiert und mit 200 µl BCA Working Reagent gemischt. Nach einer

Inkubation bei 37 °C für 30 min wurde die Absorption bei 562 nm im ELISA-Reader gemessen und die Konzentration anhand der mitgeführten Standardreihe ermittelt.

#### **4.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Auf trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (Laemmli, 1970). Dazu wurden je nach Größe des Proteins Tris-HCl-Fertiggele mit einem Anteil von 12, 10 oder 7,5 % (w/v) Polyacrylamid (s. Tab. 4) und das Mini-Protean II System der Fa. BioRad verwendet.

In Abhängigkeit von dem zu untersuchenden Protein wurden 5 - 100 µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen. Das entsprechende Volumen an Proteinextrakt wurde zusammen mit 5 x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 5:1 unter Eiskühlung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (max. Volumen 15 µl) pipettiert und gemischt. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert, anschließend sofort wieder auf Eis gestellt und in die vorbereiteten Geltaschen geladen; um die Proteine einem Molekulargewicht zuordnen zu können, wurde ein Molekulargewichtsmarker mit einem Bereich von 10 - 250 kDa der Fa. BioRad aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 2 h bzw. bis zum Auslaufen der blauen Farbstoffbande des Probenpuffers in Elektrophorese-Puffer.

#### **4.6.4 Western Blot**

Zur Detektion der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Western Blot wurden diese elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Es wurde die Blot-Apparatur der Fa. BioRad verwendet. Auf die Anodenplatte wurde ein Sandwich bestehend aus einer Glasfasermatte, drei Lagen Blottingpapier, dem Gel mit den aufgetrennten Proteinen, der Nitrozellulosemembran, nochmals drei Lagen Blottingpapier und einer weiteren Glasfasermatte sowie die Kathodenplatte aufgelegt. Nitrozellulosemembran und Blottingpapier wurden zuvor auf Gelgröße zurechtgeschnitten und für 15 min in Transferpuffer eingeweicht. Der Proteintransfer erfolgte zum Nachweis der NO-Synthase II bei verschiedenen Stromstärken in festgelegter Reihenfolge (150 mA/15 min, 250 mA/2 h, 350 mA/15 min), zum Nachweis aller anderen Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA für 2 h.

Um den Transfer zu kontrollieren und die Proteine zusätzlich auf der Membran zu fixieren, wurde der Blot für 1 min in Ponceaurot-Lösung inkubiert und die überschüssige Farbe bis

zum Erscheinen der Proteinbanden mit Wasser weggewaschen. Durch Spülen mit Wasser oder durch die Inkubation in Blockerpuffer wurde die Membran wieder vollständig entfärbt.

#### 4.6.5 Detektion membrangebundener Proteine durch Immunfärbung

Bevor die Membran mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert werden konnte, wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für 1 - 2 h in TBS-T Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver blockiert. Dieser Blockier-Puffer wurde danach durch 15-minütiges Waschen mit TBS-T Puffer entfernt.

Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C; in Abhängigkeit vom Antikörper wurde dieser zwischen 1:1000 bis 1:2000 in TBS-T Puffer mit entweder 5 % (w/v) BSA oder Magermilchpulver verdünnt (s. Tab. 4). Nach der Inkubation wurde die Membran 3 x für 10 min mit TBS-T Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären, Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Antikörper für 2 h bei RT; in Abhängigkeit vom Antikörper wurde dieser zwischen 1:1000 bis 1:2000 in TBS-T Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 x für 10 min mit TBS-T Puffer gewaschen.

Antikörper	Verdünnung	verdünnt in	Fertiggel
mouse COX-2 Ab	1:2000	Magermilch	10 % (w/v)
mouse IL-1 $\beta$ Ab	1:2000	Magermilch	12 % (w/v)
mouse NOS-II Ab	1:1000	Magermilch	7,5 % (w/v)
p38 MAPK Ab	1:1000	BSA	12 % (w/v)
p44/42 MAPK Ab	1:1000	BSA	10 % (w/v)
SAPK/JNK Ab	1:1000	BSA	10 % (w/v)
Phospho-p38 MAPK Ab	1:1000	BSA	12 % (w/v)
Phospho-p44/42 MAPK Ab	1:1000	BSA	10 % (w/v)
Phospho-SAPK/JNK Ab	1:1000	BSA	10 % (w/v)
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Ab	1:2000	Magermilch	alle
chicken anti-rabbit IgG-HRP	1:1000	Magermilch	alle
rabbit anti-goat IgG-HRP	1:2000	Magermilch	alle

Tab. 4: Verwendung verschiedener Antikörper beim Western Blot.

Die primären und sekundären Antikörper sowie deren Verdünnungen wurden so gewählt, dass nach der Blockade unspezifischer Bindungsstellen jeweils nur die gewünschten, spezifischen Banden detektiert wurden.

Die Detektion erfolgte mit dem Enhanced Chemiluminescence Kit (ECL-Kit) der Fa. Amersham. Der Nachweis beruht auf der durch Peroxidase katalysierten Oxidation von Luminol, wodurch eine Chemilumineszenz ausgelöst wird. Das Detektionsreagenz, bestehend aus einer Mischung gleicher Volumina der Detektionslösungen 1 und 2, wurde für ca. 1 min auf die Membran aufgetragen und danach sofort abgekippt. Anschließend wurde der Blot zwischen zwei Kopierfolien gelegt und durch sorgfältiges Ausstreichen mit einem Tuch von Detektionsreagenz und Luftblasen befreit. Die entstehende Lichtemission wurde nach Auflegen eines Röntgenfilms für 5 - 10 min und anschließendes Baden des Films in Entwickler und Fixierer durch Schwarzfärbung sichtbar gemacht.

#### **4.6.6 Nachweis löslicher Proteine mit dem Enzym-Immunassay**

Die Quantifizierung verschiedener Proteine wurde mit entsprechenden ELISA-Kits (Fa. R&D Systems, Fa. Cayman) nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Die Proteinextrakte aus Zellen und Geweben wurden analog zum in Kap. 4.6.1.1 beschriebenen Verfahren hergestellt; allerdings wurde anstelle des SDS-Lysispuffers PBS-Puffer verwendet, um mögliche Inkompatibilitäten mit Bestandteilen der ELISA-Kits zu vermeiden. Neben Proteinextrakten wurden auch Serumproben und Zellkulturmedium vermessen. Für alle Probenlösungen wurde in Voruntersuchungen eine geeignete Verdünnung ermittelt, die innerhalb der jeweils vorgeschriebenen Standardreihe lag, und diese dann für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt.

Die Probenlösung mit dem zu bestimmenden Protein (Antigen) wurde in die Vertiefungen einer mit spezifischen Antikörpern beschichteten Mikrotestplatte gegeben und über den vorgeschriebenen Zeitraum inkubiert. Nach der Bindung des Antigens wurde mehrfach mit entsprechenden Waschlösungen gewaschen, bevor ein zweiter antigenspezifischer Antikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist, hinzugefügt wurde; während der vorgeschriebenen Inkubationszeit konnte dieser an den Antigen-Antikörperkomplex binden. Anschließend wurde wieder mehrfach mit Waschlösung gewaschen und eine definierte Menge an Substratlösung zugegeben; aufgrund der enzymatischen Bildung farbiger Komplexe konnte die Menge an gebundenem Antikörper mit dem ELISA-Reader bei den vorgeschriebenen Wellenlängen gemessen werden. Die Konzentration des eingesetzten Antigens wurde im

Vergleich zu einer mitgeführten Standardkurve unter Berücksichtigung spezifischer Positiv- und Negativkontrollen bestimmt.

#### **4.6.7 Kolorimetrische Bestimmung von Stickstoffmonoxid**

Die NO-Synthase-Aktivität wurde indirekt über die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) bzw. Nitrit und Nitrat kolorimetrisch mit dem Assay-Kit der Fa. Cayman gemessen. Die Proteinextrakte aus Gewebe wurden analog zum in Kap. 4.6.1.1 beschriebenen Verfahren hergestellt; anstelle des SDS-Lysispuffers wurde PBS-Puffer verwendet, um mögliche Inkompatibilitäten mit Bestandteilen des Assays zu vermeiden. Neben den Gewebe-Proteinextrakten wurden auch Serumproben vermessen.

Zum Abtrennen von Proteinen mit einem Molekulargewicht über 10 kDa und zum Aufkonzentrieren der Probenlösung wurde diese unter Verwendung der Microcon® YM-10 Filtereinheiten (Fa. Millipore) für 25 min bei 12000 U/min und RT zentrifugiert. Das Filtrat konnte direkt oder in einer geeigneten Verdünnung zur Durchführung des Assays verwendet werden.

Die Probenlösung wurde in die Vertiefungen einer Mikrotestplatte gegeben und zur Reduktion des Nitrats zu Nitrit mit einer Mixtur aus Reduktase und enzymatischen Cofaktoren über einen Zeitraum von 3 h inkubiert. Nach Zugabe der Griess Reagenzien 1 und 2 bildete sich ein violetter Farbkomplex, der mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 540 nm vermessen werden konnte. Die Gesamtkonzentration an Nitrat bzw. Nitrit wurde im Vergleich zu einer mitgeführten Standardkurve unter Berücksichtigung spezifischer Positiv- und Negativkontrollen bestimmt.

### **4.7 Statistik**

Alle Messdaten sind als arithmetische Mittelwerte ( $x \pm SEM$ ; Standardfehler des Mittelwerts) ausgedrückt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte für interindividuelle Vergleiche mittels ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse) und für intraindividuelle Vergleiche anhand des zweiseitigen Student's t-Tests. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  wurde bei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.

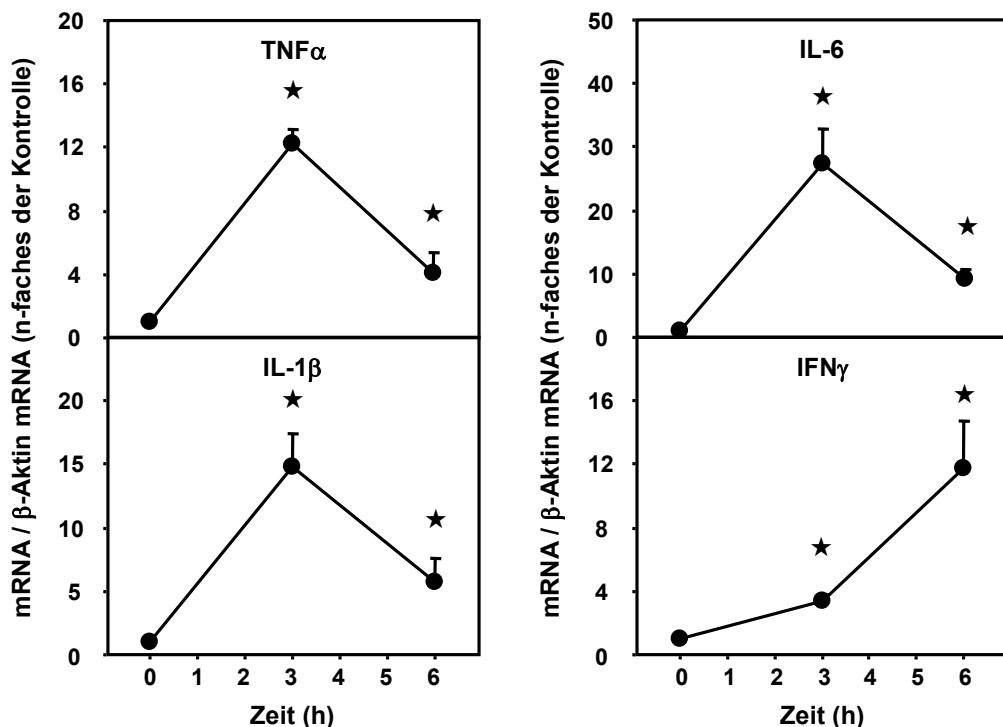
# 5 Ergebnisse

## 5.1 Modell einer akuten Lungenentzündung

### 5.1.1 Einfluss einer nasalen LPS-Applikation auf die Bildung von Entzündungsmediatoren in der Lunge

#### 5.1.1.1 mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in der Lunge

Nach nasaler Applikation von LPS wurde die Expression der mRNA von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in der Lunge über einen Zeitraum von 6 h untersucht. Die nasale Applikation von LPS führte in der Lunge zeitabhängig zu einer signifikant gesteigerten Expression der mRNA von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  (Abb. 9).

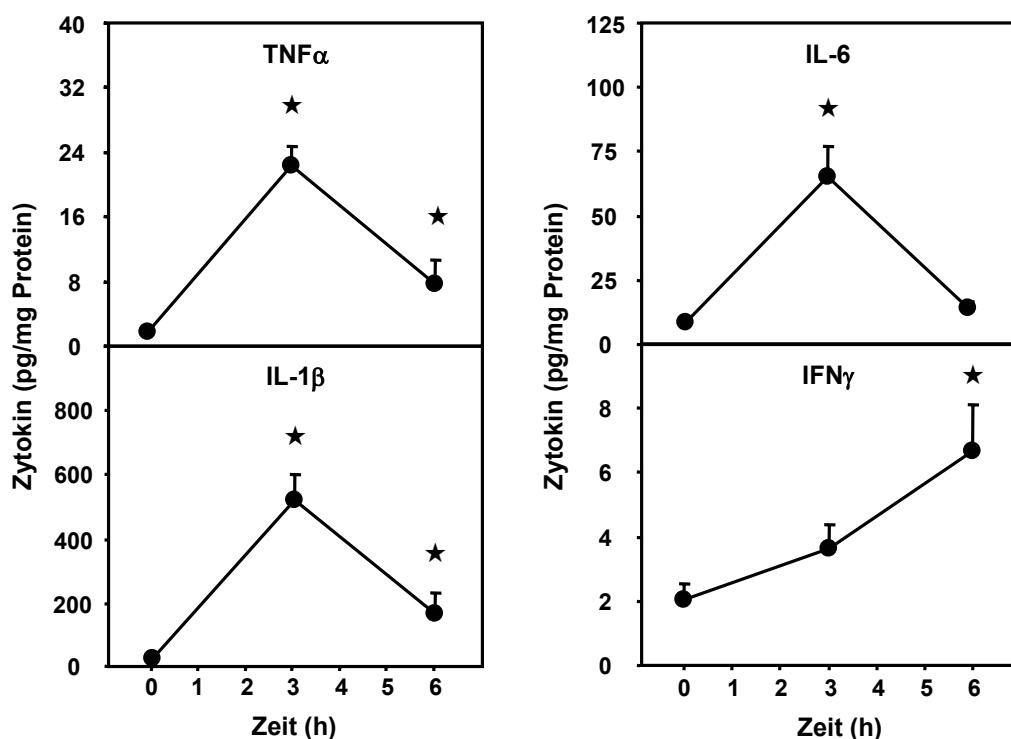


**Abb. 9: Zeitlicher Effekt von nasal verabreichtem LPS auf die mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in der Lunge.** Die Mäuse erhielten eine nasale Applikation von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der Zytokin-mRNA wurde vor (0 h) sowie 3 h und 6 h nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe;  $\star$  p < 0,05 vs. Kontrolle (0 h)

Die Bildung der mRNA von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 war zu den Zeitpunkten 3 h und 6 h nach LPS-Applikation erhöht, wobei jeweils ein Maximum nach 3 h erreicht wurde. LPS führte zu den Zeitpunkten 3 h und 6 h nach LPS-Applikation auch zu einer vermehrten Abundanz der IFN $\gamma$  mRNA, die zum Zeitpunkt 6 h den höchsten gemessenen Wert annahm.

### 5.1.1.2 Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in Lunge und Plasma

Nachfolgend wurde die Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in der Lunge und im Plasma über einen Zeitraum von 6 h bestimmt. Nach nasaler LPS-Applikation kam es in der Lunge zeitabhängig zu einer signifikant vermehrten Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  Protein (Abb. 10).



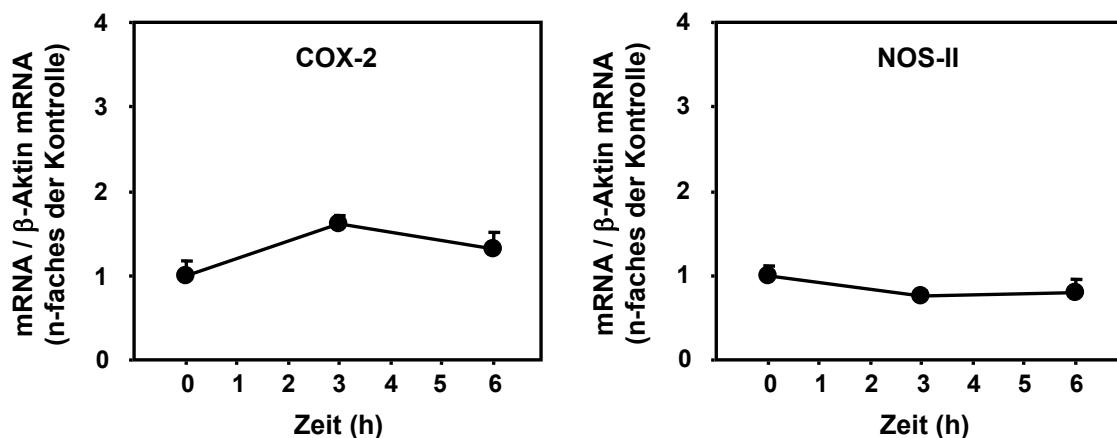
**Abb. 10: Zeitlicher Effekt von nasal verabreichtem LPS auf die Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  Protein in der Lunge.** Die Mäuse erhielten eine nasale Applikation von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Gewebekonzentration der Zytokine wurde vor (0 h) sowie 3 h und 6 h nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt und auf die Menge an Gesamtprotein im Gewebe bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe;  $\star$  p < 0,05 vs. Kontrolle (0 h)

Die Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 Protein wurde jeweils zum Zeitpunkt 3 h nach LPS-Applikation maximal gesteigert, und nahm danach wieder bis fast auf Ausgangsniveau ab. Die Proteinbildung von IFN $\gamma$  setzte verzögert ein und erreichte zum Zeitpunkt 6 h nach LPS-Applikation den höchsten gemessenen Wert.

Als Kontrolle für die lokale Entzündung wurde die Bestimmung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  Protein auch im Plasma durchgeführt. Jedoch war zu keinem Zeitpunkt nach LPS-Applikation ein signifikanter Anstieg der Zytokine messbar (Daten nicht gezeigt). In den nachfolgenden Experimenten wurde daraufhin auf die Bestimmung der Zytokin-Konzentration im Plasma verzichtet.

#### 5.1.1.3 mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II in der Lunge

Infolge der vermehrten Produktion von Zytokinen nach nasaler LPS-Gabe wurde auch die mRNA-Expression der induzierbaren Enzyme COX-2 und NOS-II in der Lunge über einen Zeitraum von 6 h untersucht. Jedoch bewirkte die nasale Applikation von LPS zu keinem der gemessenen Zeitpunkte einen signifikanten Anstieg der COX-2 bzw. NOS-II mRNA (Abb. 11).



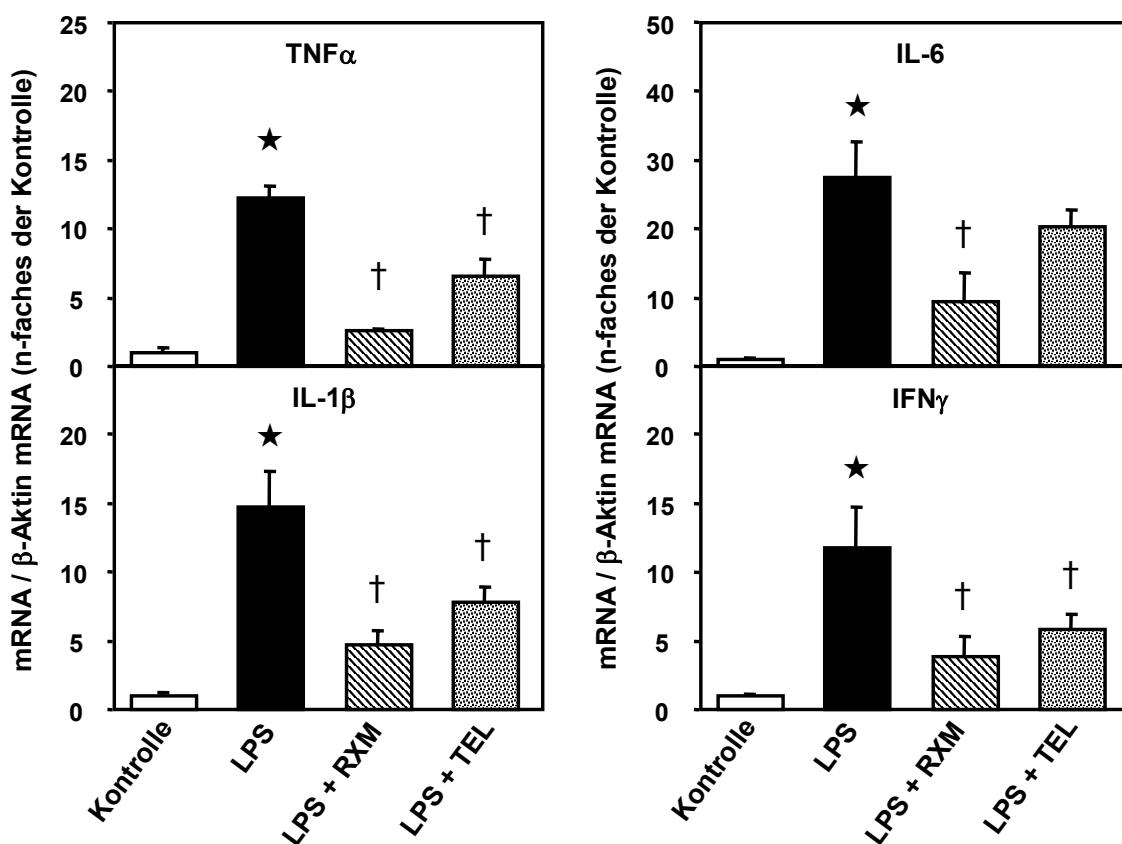
**Abb. 11: Zeitlicher Effekt von nasal verabreichtem LPS auf die mRNA-Expression COX-2 und NOS-II in der Lunge.** Die Mäuse erhielten eine nasale Applikation von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der COX-2 bzw. NOS-II mRNA wurde vor (0 h) sowie 3 h und 6 h nach LPS-Applikation nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe

Aufgrund der ausbleibenden Induktion beider Enzyme durch die nasale Applikation von LPS wurde in den nachfolgenden Experimenten auf die Bestimmung der mRNA von COX-2 und NOS-II sowie auf eine Bestimmung von Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid verzichtet.

## 5.1.2 Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die Induktion von Zytokinen nach nasaler LPS-Gabe

### 5.1.2.1 Einfluss auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in der Lunge

Es wurde der Einfluss der Antibiotika Roxithromycin (RXM) und Telithromycin (TEL) auf die LPS-induzierte mRNA-Expression der Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in der Lunge untersucht. Durch eine Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin und Telithromycin wurde die durch LPS verursachte Induktion der TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  mRNA signifikant abgeschwächt (Abb. 12).



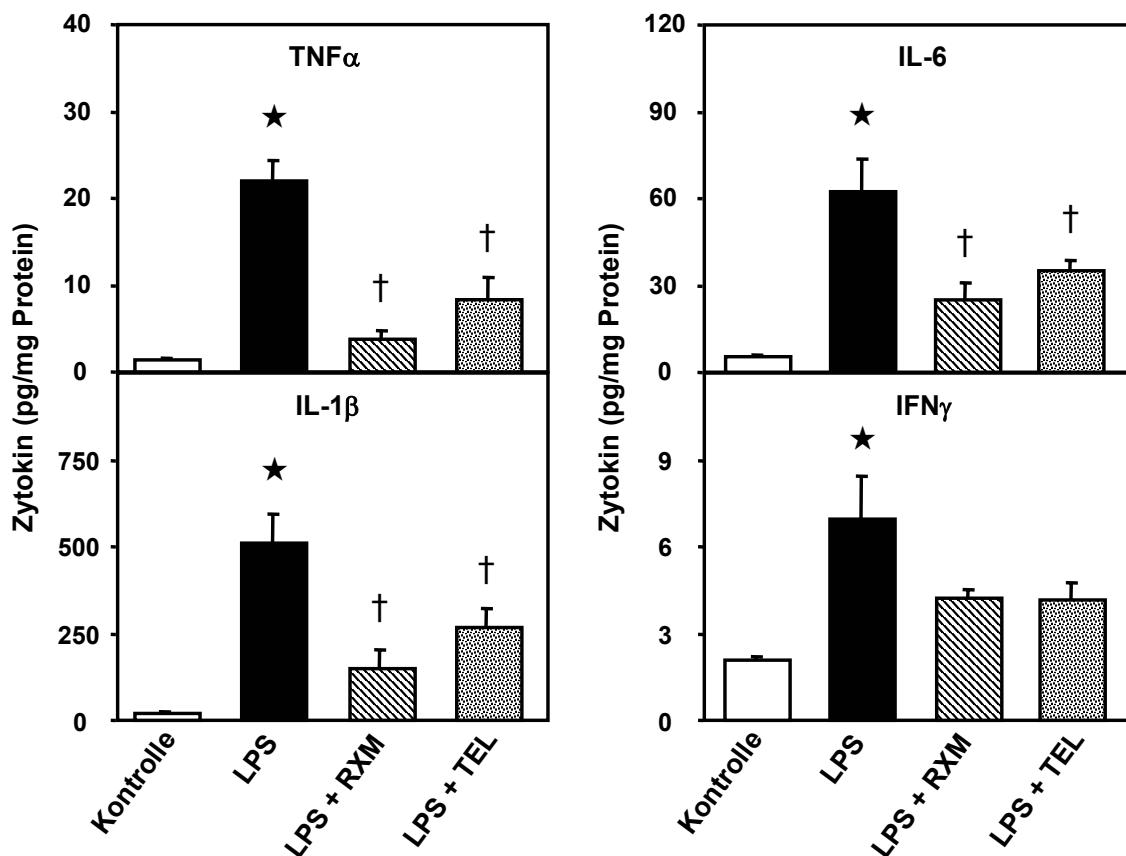
**Abb. 12: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in der Lunge.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine nasale Applikation von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der Zytokin-mRNA wurde 3 h (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6) oder 6 h (IFN $\gamma$ ) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Unter Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die durch LPS induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$  um 78 % bzw. 46 %, von IL-1 $\beta$  um 68 % bzw. 47 % und von

IFN $\gamma$  um 67 % bzw. 50 % verringert. Die LPS-induzierte Bildung der IL-6 mRNA wurde bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin um 66 %, bei gleichzeitiger Gabe von Telithromycin nur um 26 %, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen, vermindert.

### 5.1.2.2 Einfluss auf die LPS-induzierte Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in der Lunge

Der Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  Protein in der Lunge wurde ebenfalls untersucht. Eine Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin führte in der Lunge nach LPS-Stimulation zur reduzierten Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  Protein (Abb. 13).



**Abb. 13: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  Protein in der Lunge.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine nasale Applikation von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Gewebekonzentration der Zytokine wurde 3 h (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6) oder 6 h (IFN $\gamma$ ) nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt und auf die Menge an Gesamtprotein im Gewebe bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Die Gabe von Roxithromycin bzw. Telithromycin senkte die durch LPS induzierte Bildung von TNF $\alpha$  von ca. 22 pg/mg Protein auf ca. 4 bzw. 9 pg/mg Protein, die Bildung von IL-1 $\beta$

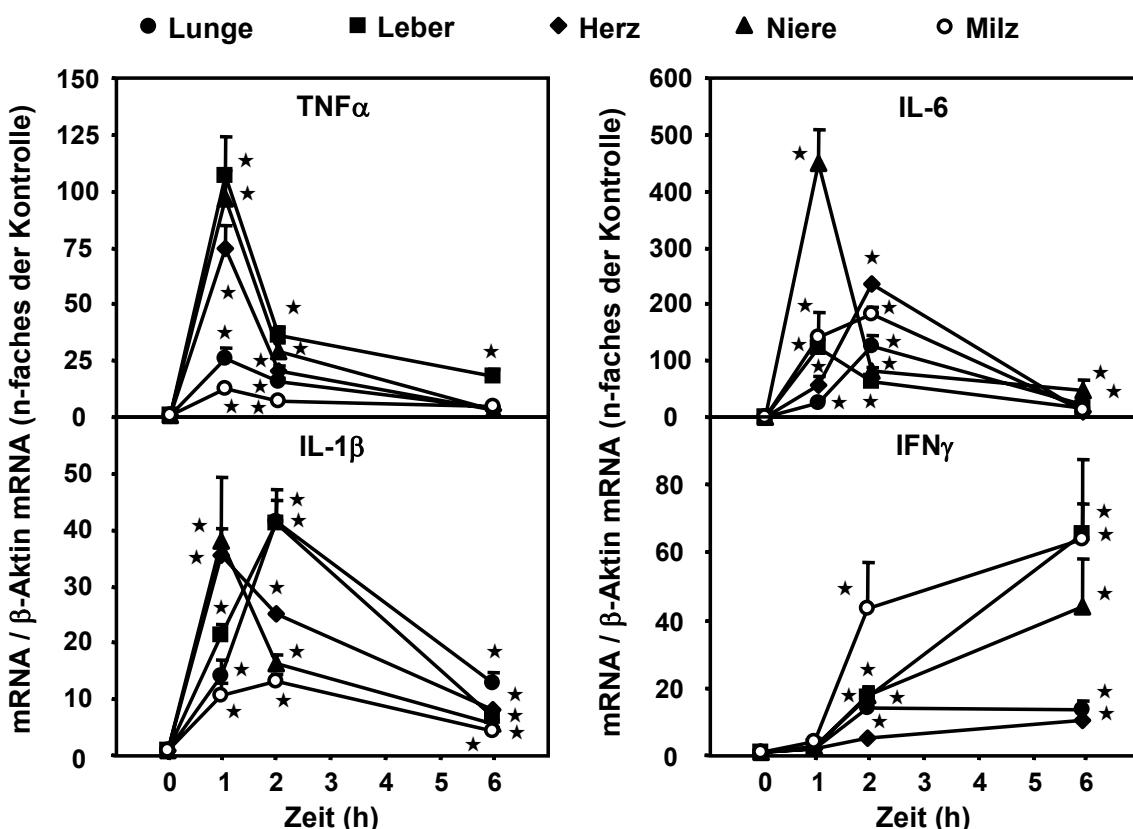
von ca. 510 pg/mg Protein auf ca. 150 bzw. 270 pg/mg Protein und die Bildung von IL-6 von ca. 60 pg/mg Protein auf ca. 25 bzw. 35 pg/mg Protein. Die LPS-induzierte Bildung von IFN $\gamma$  wird bei gleichzeitiger Applikation von Roxithromycin bzw. Telithromycin von ca. 7 pg/mg Protein auf jeweils ca. 4 pg/mg Protein verringert, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen.

## 5.2 Modell einer akuten systemischen Entzündung

### 5.2.1 Einfluss einer intraperitonealen LPS-Applikation auf die Bildung von Entzündungsmediatoren in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz

#### 5.2.1.1 mRNA-Expression von $\text{TNF}\alpha$ , $\text{IL-1}\beta$ , $\text{IL-6}$ und $\text{IFN}\gamma$ in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz

Nach einer intraperitonealen Applikation von LPS wurde die mRNA-Expression von  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  und  $\text{IFN}\gamma$  in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz über einen Zeitraum von 6 h untersucht. Die intraperitoneale Applikation von LPS führte in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz zeitabhängig zu einer signifikant gesteigerten Expression der  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  und  $\text{IFN}\gamma$  mRNA (Abb. 14).

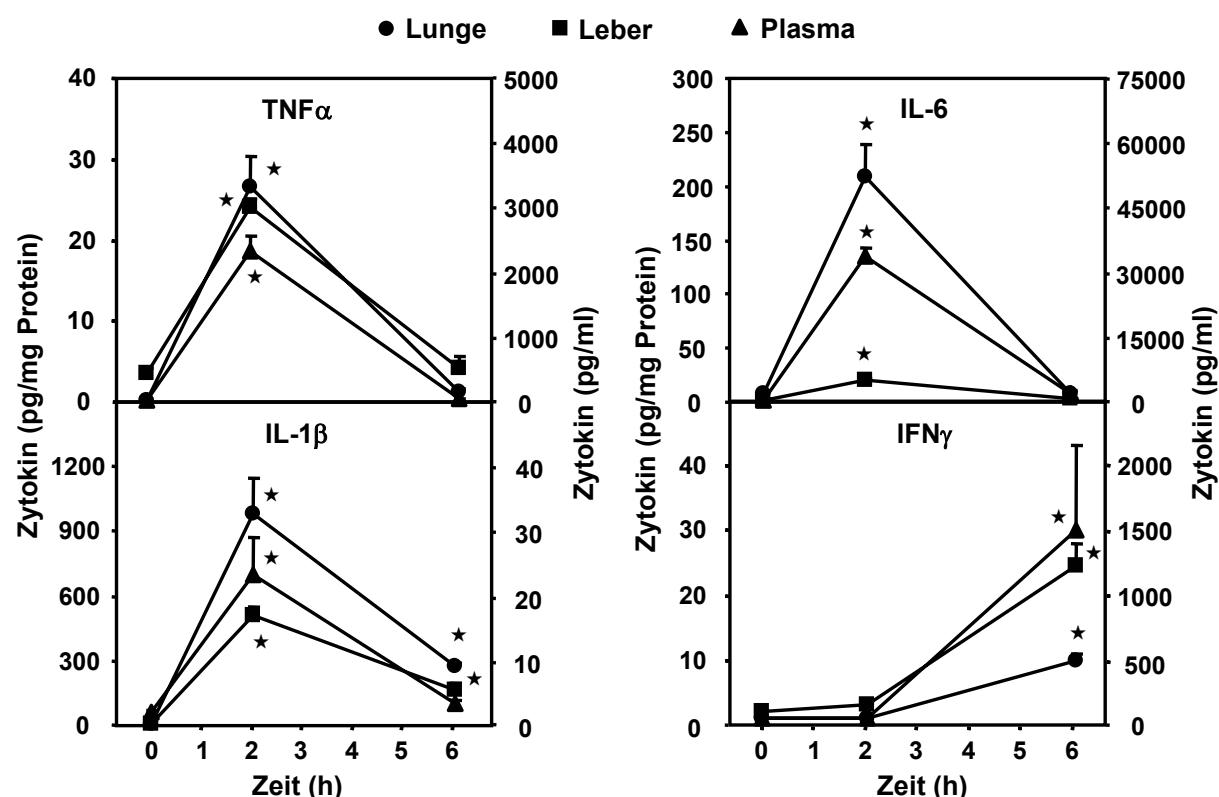


**Abb. 14:** Zeitlicher Effekt von intraperitoneal verabreichtem LPS auf die mRNA-Expression von  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  und  $\text{IFN}\gamma$  in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz. Die Mäuse erhielten eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der Zytokin-mRNA wurde vor (0 h) sowie 1 h, 2 h und 6 h nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 5$  Tieren pro Gruppe;  $\star p < 0,05$  vs. Kontrolle (0 h)

Die Bildung der TNF $\alpha$  mRNA war in allen Organen zu den Zeitpunkten 1 h und 2 h nach LPS-Applikation erhöht, wobei jeweils ein Maximum nach 1 h erreicht wurde. LPS steigerte zu allen gemessenen Zeitpunkten auch die Expression der IL-1 $\beta$  mRNA; dabei wurde in Herz und Niere ein Maximum nach 1 h, in Lunge, Leber und Milz ein Maximum nach 2 h erreicht. Die Abundanz der IL-6 mRNA war in allen Organen zu den Zeitpunkten 1 h und 2 h nach LPS-Applikation erhöht; ein Maximum wurde in Leber und Niere nach 1 h, in Lunge, Herz und Milz nach 2 h erreicht. LPS führte in allen Organen zu einer vermehrten mRNA-Expression von IFN $\gamma$ , die zum Zeitpunkt 6 h den höchsten gemessenen Wert erreichte.

### 5.2.1.2 Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in Lunge, Leber und Plasma

Die Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  infolge der intraperitonealer Applikation von LPS wurde in Lunge, Leber und Plasma über einen Zeitraum von 6 h untersucht. Die intraperitoneale Applikation von LPS führte in Lunge, Leber und Plasma zeitabhängig zu einer signifikant gesteigerten Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  Protein (Abb. 15).

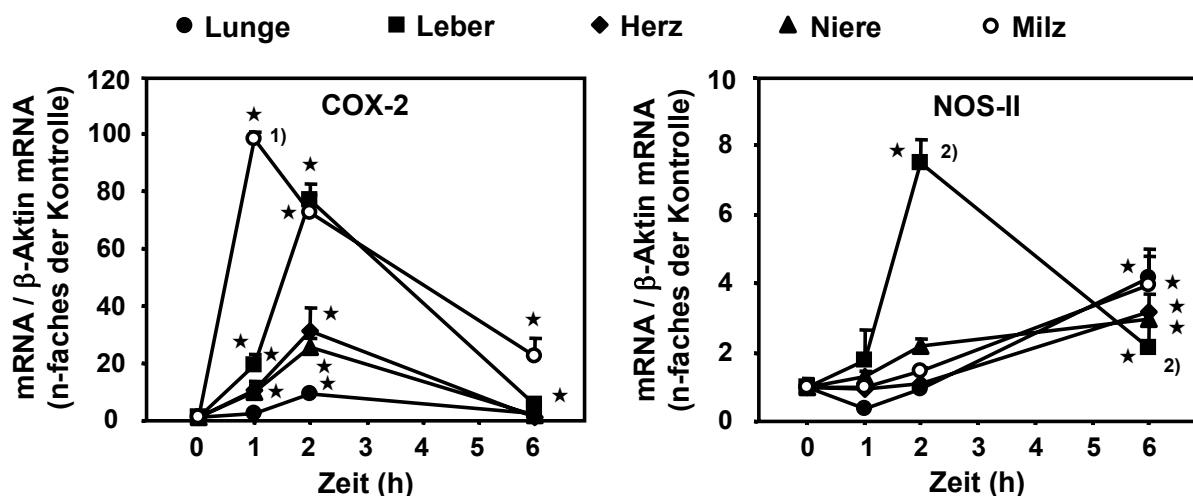


**Abb. 15: Zeitlicher Effekt von intraperitoneal verabreichtem LPS auf die Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  Protein in Lunge, Leber und Plasma.** Die Mäuse erhielten eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Gewebe- bzw. Plasmakonzentration der Zytokine wurde vor (0 h) sowie 2 h und 6 h nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe;  $\star$  p < 0,05 vs. Kontrolle (0 h)

Die Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 Protein war in Lunge, Leber und Plasma zum Zeitpunkt 2 h nach LPS-Applikation jeweils maximal erhöht. Die Proteinexpression von IFN $\gamma$  setzte in Lunge, Leber und Plasma erst verzögert ein und erreichte zum Zeitpunkt 6 h nach LPS-Applikation den höchsten gemessenen Wert.

### 5.2.1.3 mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz

Aufgrund der gesteigerten Zytokin-Produktion nach intraperitonealer Gabe von LPS wurde auch die mRNA-Expression der induzierbaren Enzyme COX-2 und NOS-II in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz über einen Zeitraum von 6 Stunden untersucht. Die intraperitoneale Applikation von LPS führte in allen Organen zeitabhängig zu einer signifikant vermehrten Expression der COX-2 und NOS-II mRNA (Abb. 16).

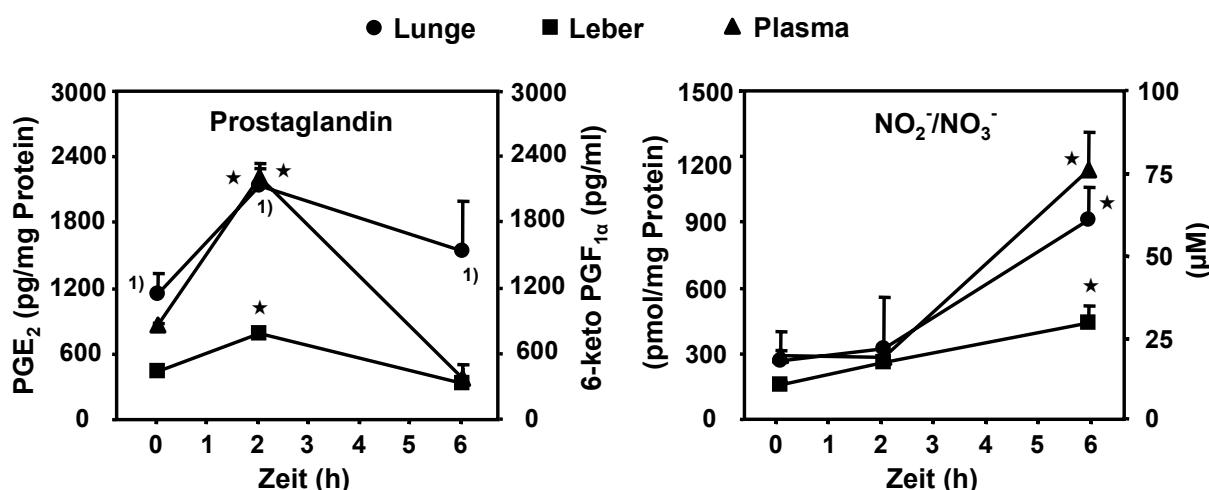


**Abb. 16: Zeitlicher Effekt von intraperitoneal verabreichtem LPS auf die mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz.** Die Mäuse erhielten eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der COX-2 bzw. NOS-II mRNA wurde vor (0 h) sowie 1 h, 2 h und 6 h nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 5$  Tieren pro Gruppe; 1) Werte dividiert durch 3; 2) Werte dividiert durch 10;  $\star$   $p < 0,05$  vs. Kontrolle (0 h)

In allen Organen wurde die Bildung der COX-2 mRNA 1 h und 2 h nach LPS-Applikation gesteigert, wobei in der Milz ein Maximum bereits nach 1 h, in den anderen Organen nach 2 h erreicht wurde. LPS induzierte die Expression der NOS-II mRNA in der Leber ab dem Zeitpunkt 2 h nach LPS-Applikation, zu diesem auch die maximale Stimulation erreicht wurde. In allen anderen Organen setzte die NOS-II mRNA-Expression erst verzögert ein und erreichte 6 h nach LPS-Applikation den höchsten gemessenen Wert.

#### 5.2.1.4 Bildung von Prostaglandinen und Entstehung von Stickstoffmonoxid in Lunge, Leber und Plasma

Nach der Bestimmung der mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II wurde auch die Bildung von Prostaglandinen (PG) sowie die Entstehung von Stickstoffmonoxid (NO) nach intraperitonealer Gabe von LPS in Lunge, Leber und Plasma über einen Zeitraum von 6 h untersucht. Die intraperitoneale Applikation von LPS führte in Lunge, Leber und Plasma zeitabhängig zu einer signifikant gesteigerten Bildung der Prostaglandine PGE<sub>2</sub> bzw. 6-keto-PGF<sub>1α</sub> sowie von Stickstoffmonoxid, gemessen als Gesamtkonzentration von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Abb. 17).



**Abb. 17: Zeitlicher Effekt von intraperitoneal verabreichten LPS auf die Bildung von Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid in Lunge, Leber und Plasma.** Die Mäuse erhielten eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Gewebe- bzw. Plasmakonzentration der Prostaglandine wurde vor (0 h) bzw. 2 h und 6 h nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt. Die Messung der Gewebe- bzw. Plasmakonzentration von NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> erfolgte vor (0 h) bzw. 2 h und 6 h nach LPS-Applikation mithilfe colorimetrischer Assays. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; 1) Werte dividiert durch 10; ★ p < 0,05 vs. Kontrolle (0 h)

Die Bildung von PGE<sub>2</sub> war in Lunge und Leber jeweils 2 h nach LPS-Applikation maximal erhöht. Im Plasma ist die Bildung von 6-keto PGF<sub>1α</sub> ebenfalls 2 h nach LPS-Applikation maximal induziert. Analog zur mRNA-Expression von NOS-II steigerte LPS in Lunge, Leber und Plasma auch die Entstehung von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup> zeitlich verzögert. Der höchste gemessene Wert wurde dabei jeweils 6 h nach LPS-Applikation erreicht.

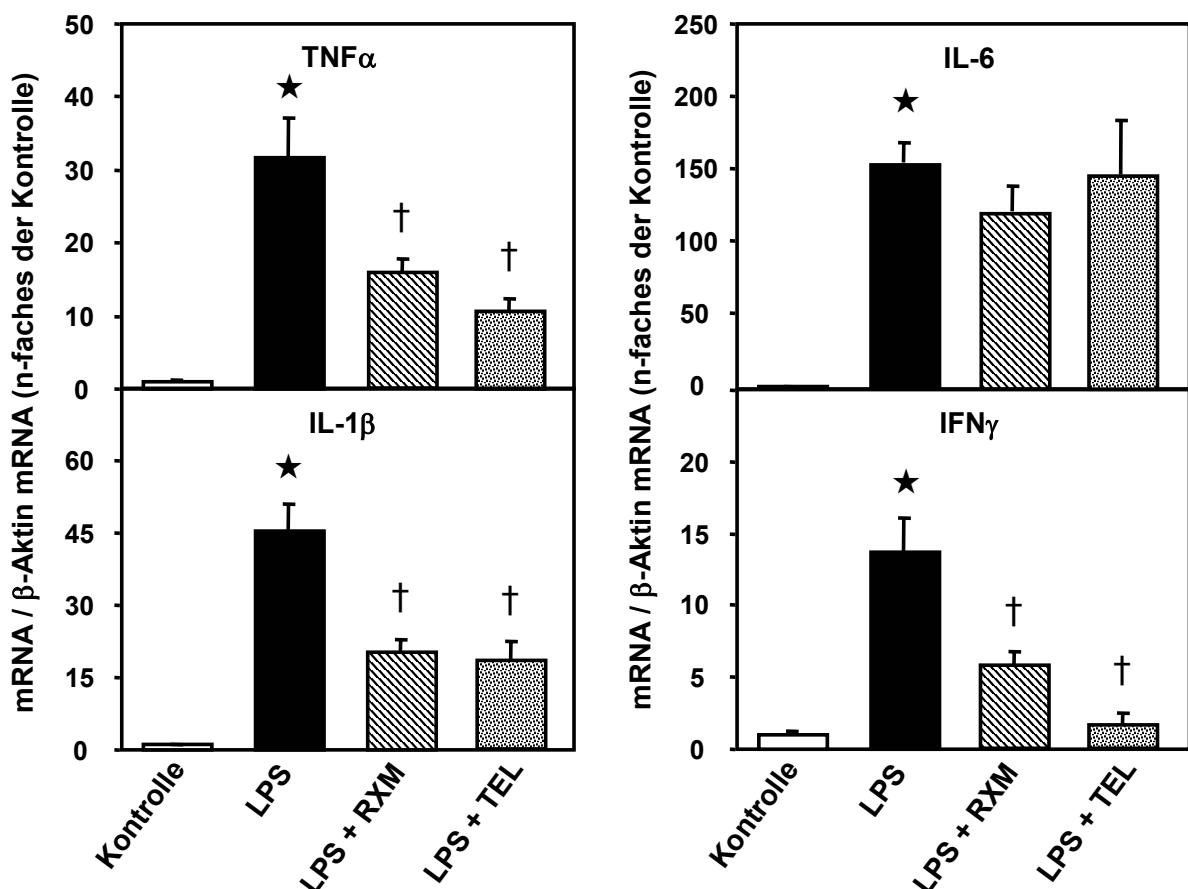
## 5.2.2 Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die Induktion von Entzündungsmediatoren nach intraperitonealer LPS-Gabe

### 5.2.2.1 Einfluss auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz

Es wurde der Einfluss der Antibiotika Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression der Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz untersucht.

#### Lunge:

Eine Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin verminderte signifikant die LPS-vermittelte Induktion der TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN $\gamma$  mRNA in der Lunge (Abb. 18).

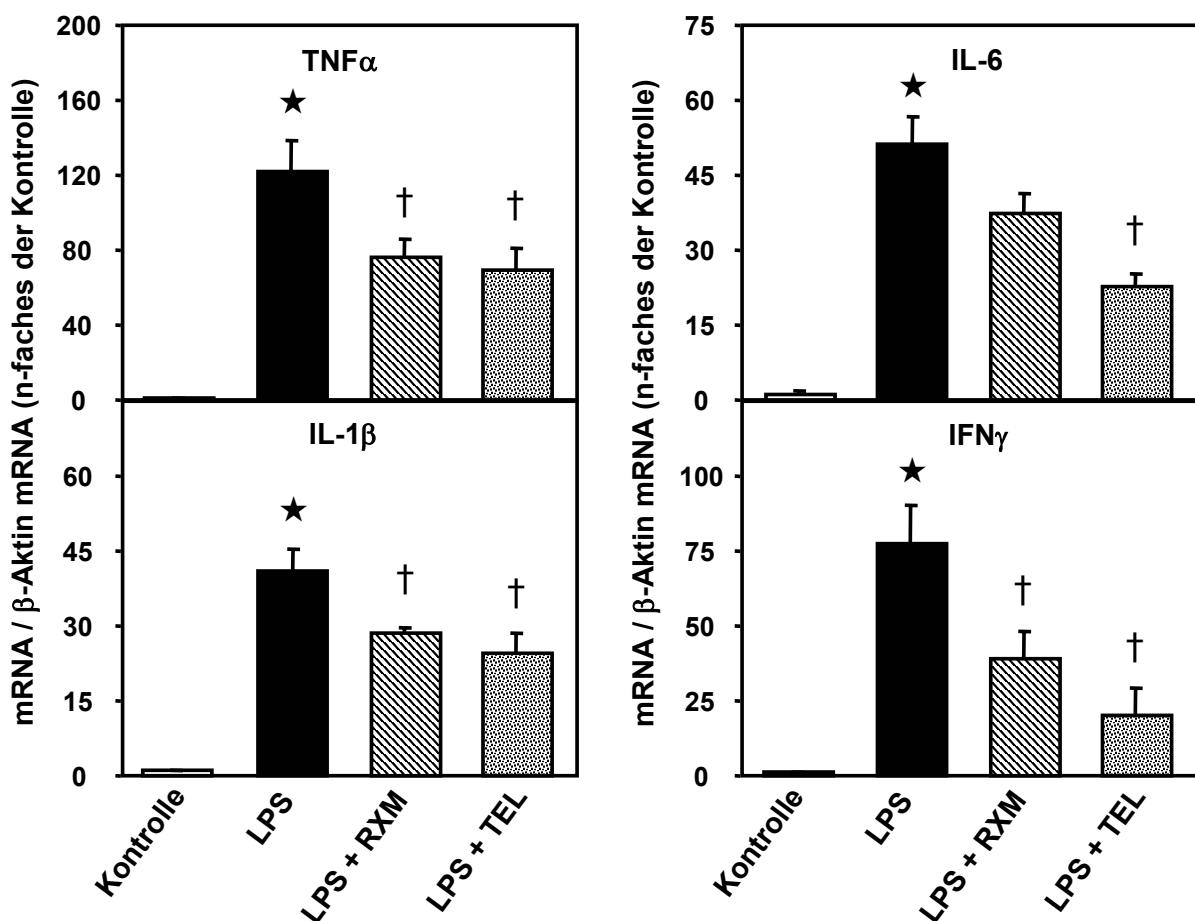


**Abb. 18: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in der Lunge.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der Zytokin-mRNA wurde 1 h (TNF $\alpha$ ), 2 h (IL-1 $\beta$  und IL-6) oder 6 h (IFN $\gamma$ ) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe;  $\star$  p < 0,05 vs. Kontrolle,  $\dagger$  p < 0,05 vs. LPS.

Unter Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die durch LPS induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$  um 50 % bzw. 67 %, von IL-1 $\beta$  um 55 % bzw. 59 % und von IFN $\gamma$  um 58 % bzw. 88 % gesenkt. Hingegen wurde die LPS-induzierte Expression der IL-6 mRNA bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin oder Telithromycin kaum verringert.

### Leber:

Durch die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin kam es auch in der Leber zur signifikanten Abschwächung der LPS-induzierten Bildung der TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  mRNA (Abb. 19).



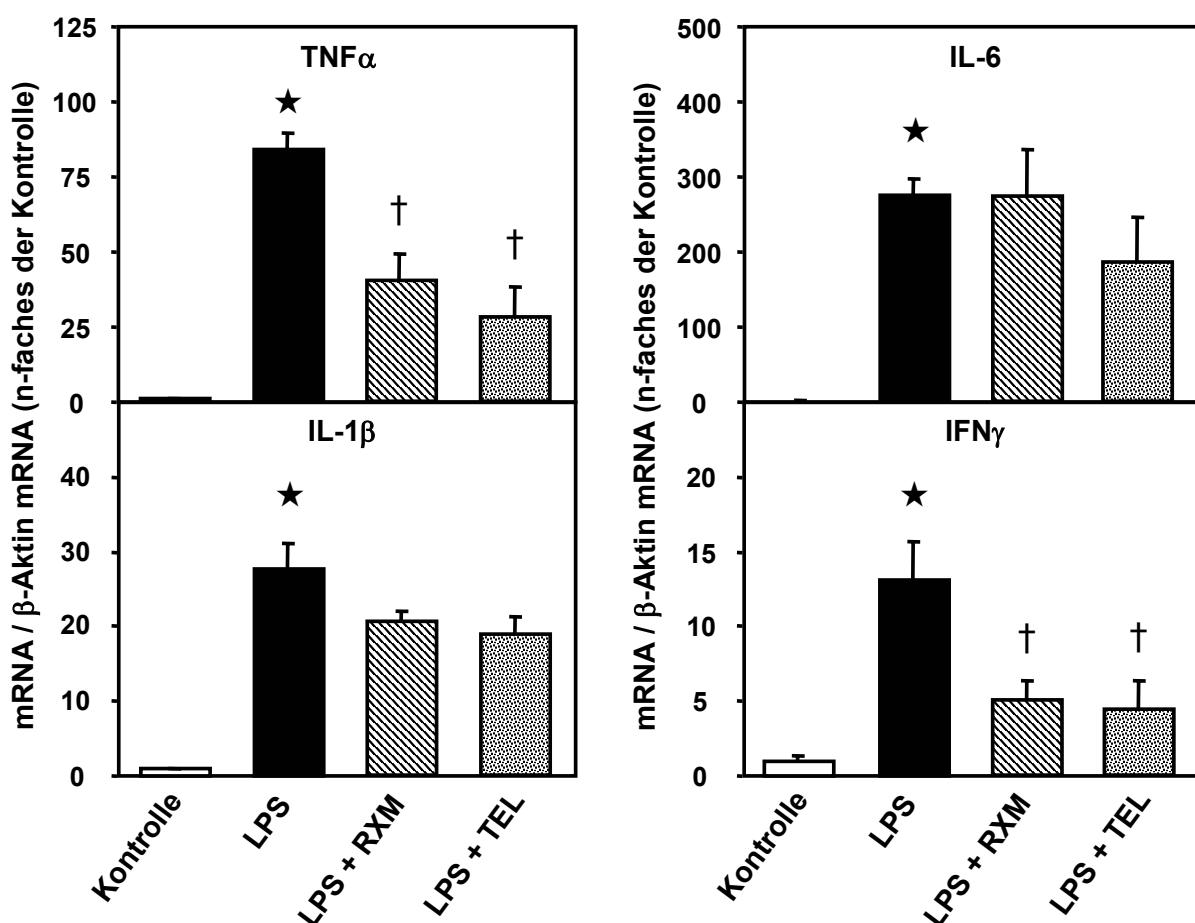
**Abb. 19: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in der Leber.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der Zytokin-mRNA wurde 1 h (TNF $\alpha$ ), 2 h (IL-1 $\beta$  und IL-6) oder 6 h (IFN $\gamma$ ) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Unter Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die durch LPS induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$  um 37 % bzw. 40 %, von IL-1 $\beta$  um 30 % bzw. 40 % und von

IFN $\gamma$  um 50 % bzw. 74 % verringert. Die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-6 wurde bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin um 27 %, bei Gabe von Telithromycin um 55 % gesenkt, wobei in der Gruppe der mit Roxithromycin behandelten Tiere keine Signifikanz erreicht wurde.

### Herz:

Im Herzen führte die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin nach Stimulation mit LPS zur signifikant verminderten Induktion der mRNA von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  (Abb. 20).



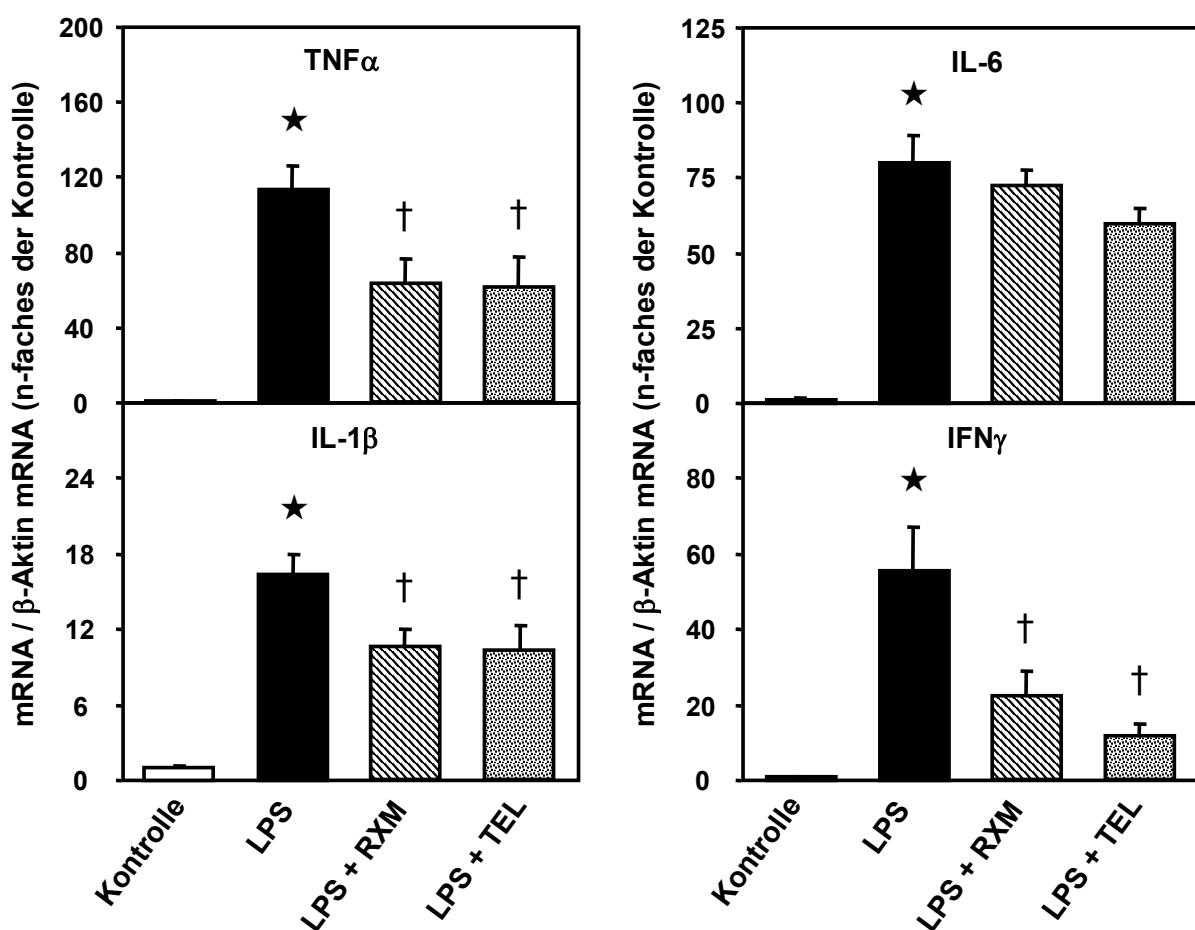
**Abb. 20: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  im Herzen.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der Zytokin-mRNA wurde 1 h (TNF $\alpha$ ), 2 h (IL-1 $\beta$  und IL-6) oder 6 h (IFN $\gamma$ ) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS.

Unter dem Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$  um 52 % bzw. 66 % und von IFN $\gamma$  um 62 % bzw. 66 % gesenkt. Die Induktion der IL-1 $\beta$  mRNA nach LPS-Stimulation wurde bei gleichzeitiger Gabe

von Roxithromycin bzw. Telithromycin zwar um 26 % bzw. 32 % verringert, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen. Die LPS-induzierte Expression der IL-6 mRNA wurde bei zusätzlicher Gabe von Roxithromycin bzw. Telithromycin nicht bzw. nur marginal vermindert.

### Niere:

Durch die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin kam es in der Niere zur signifikanten Verminderung der LPS-induzierten Bildung der TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN $\gamma$  mRNA (Abb. 21).



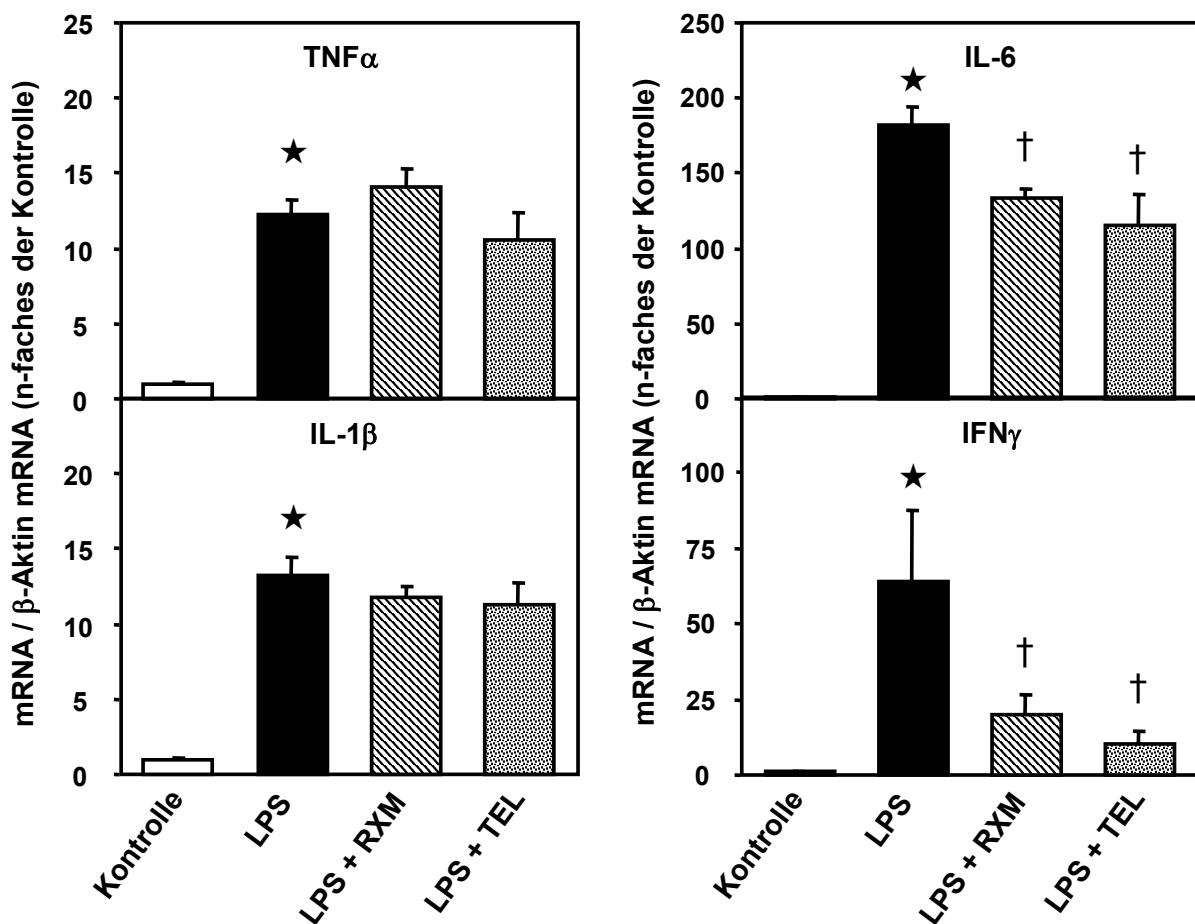
**Abb. 21: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in der Niere.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der Zytokin-mRNA wurde 1 h (TNF $\alpha$ ), 2 h (IL-1 $\beta$  und IL-6) oder 6 h (IFN $\gamma$ ) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; ★ p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin oder Telithromycin wurde die durch LPS induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$  um 45 % bzw. 46 %, von IL-1 $\beta$  um 35 % bzw. 37 %

und von  $\text{IFN}\gamma$  um 60 % bzw. 79 % vermindert. Hingegen wurde die LPS-induzierte Expression der IL-6 mRNA unter Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin nicht bzw. nur geringfügig und ohne Signifikanz zu erreichen abgeschwächt.

#### Milz:

In der Milz verminderte die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin signifikant die LPS-vermittelte Induktion IL-6 und  $\text{IFN}\gamma$  mRNA (Abb. 22).



**Abb. 22: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , IL-6 und  $\text{IFN}\gamma$  in der Milz.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der Zytokin-mRNA wurde 1 h ( $\text{TNF}\alpha$ ), 2 h ( $\text{IL-1}\beta$  und IL-6) oder 6 h ( $\text{IFN}\gamma$ ) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 5$  Tieren pro Gruppe; \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, †  $p < 0,05$  vs. LPS

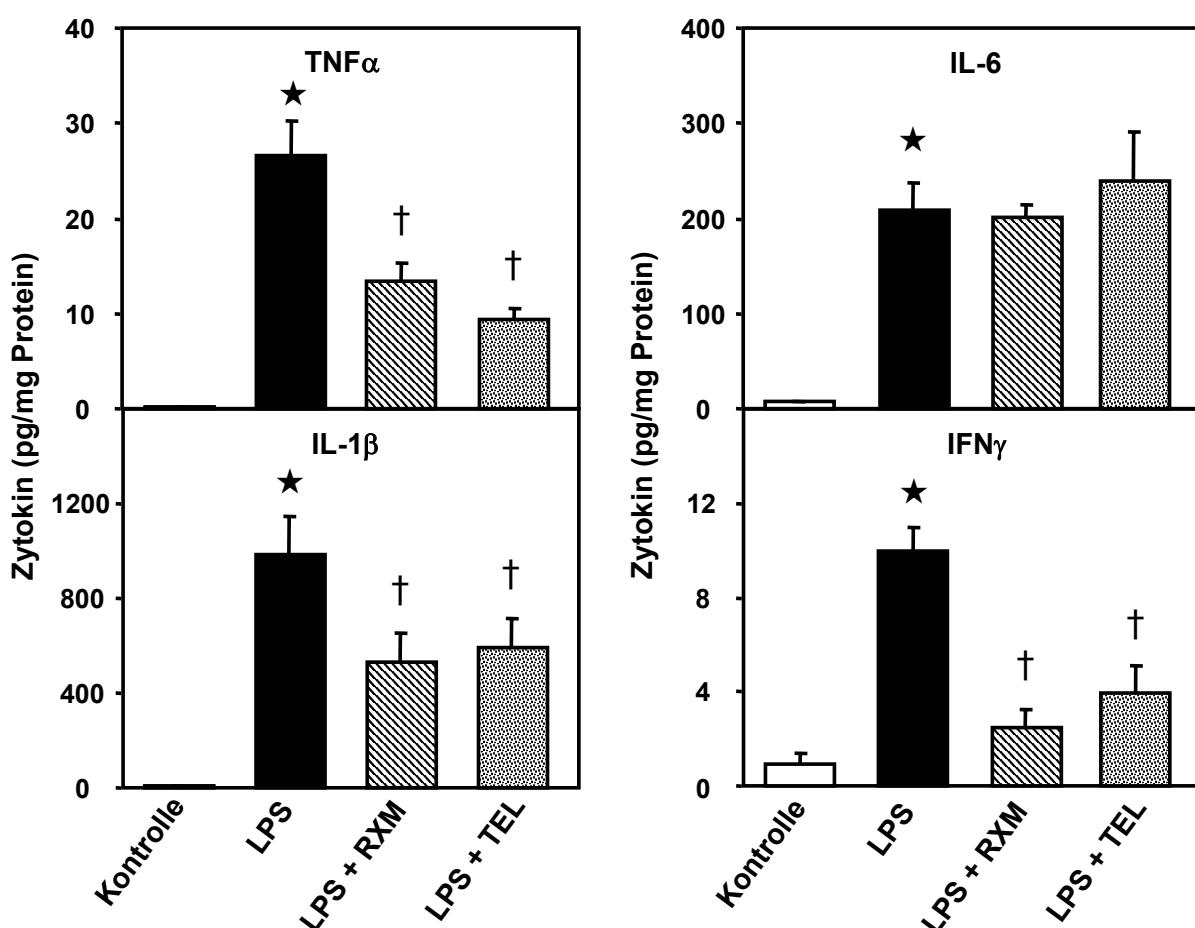
Bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die LPS-induzierte Expression der mRNA von IL-6 um 27 % bzw. 37 % und von  $\text{IFN}\gamma$  und um 76 % bzw. 88 % verringert. Unter Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde weder die durch LPS induzierte mRNA-Expression von  $\text{TNF}\alpha$  noch die von  $\text{IL-1}\beta$  signifikant gesenkt.

### 5.2.2.2 Einfluss auf die LPS-induzierte Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$ in Lunge, Leber und Plasma

Der Einfluss der Antibiotika Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung der Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  wurde in Lunge, Leber und Plasma untersucht.

#### Lunge:

Durch eine Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin kam es in der Lunge nach LPS-Stimulation zur signifikant reduzierten Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN $\gamma$  (Abb. 23).

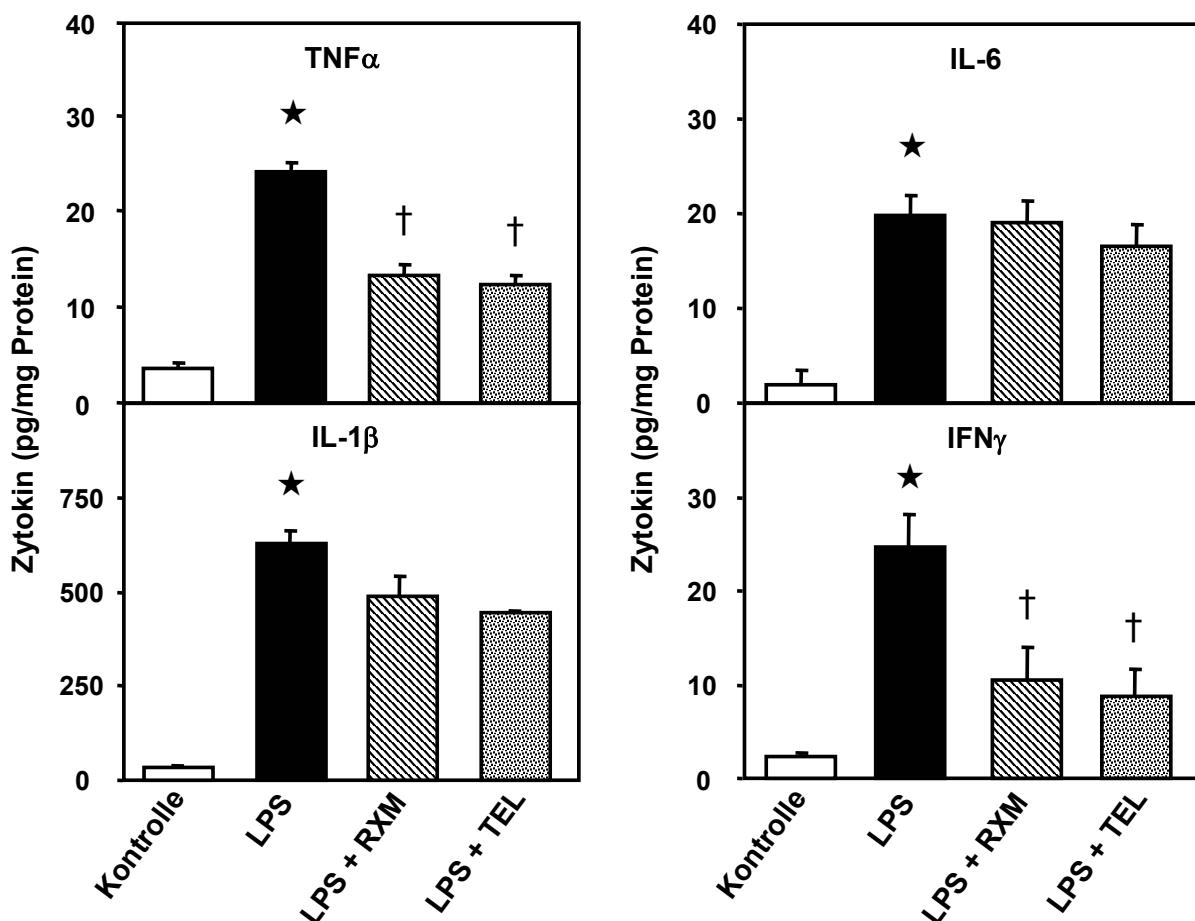


**Abb. 23: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  Protein in der Lunge.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Gewebekonzentration der Zytokine wurde 2 h (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6) oder 6 h (IFN $\gamma$ ) nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt und auf die Menge an Gesamtprotein im Gewebe bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe;  $\star$  p < 0,05 vs. Kontrolle,  $\dagger$  p < 0,05 vs. LPS

Unter Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$  von ca. 27 pg/mg Protein auf ca. 13 bzw. 9 pg/mg Protein, die Bildung von IL-1 $\beta$  von ca. 990 pg/mg Protein auf ca. 540 bzw. 590 pg/mg Protein und die Bildung von IFN $\gamma$  von ca. 10 pg/mg Protein auf ca. 2,5 bzw. 4 pg/mg Protein gesenkt. Dagegen veränderte sich die LPS-induzierte Proteinbildung von IL-6 bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin oder Telithromycin nicht.

#### Leber:

In der Leber führt die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin nach der Stimulation mit LPS zur signifikant verminderten Proteinbildung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  (Abb. 24).

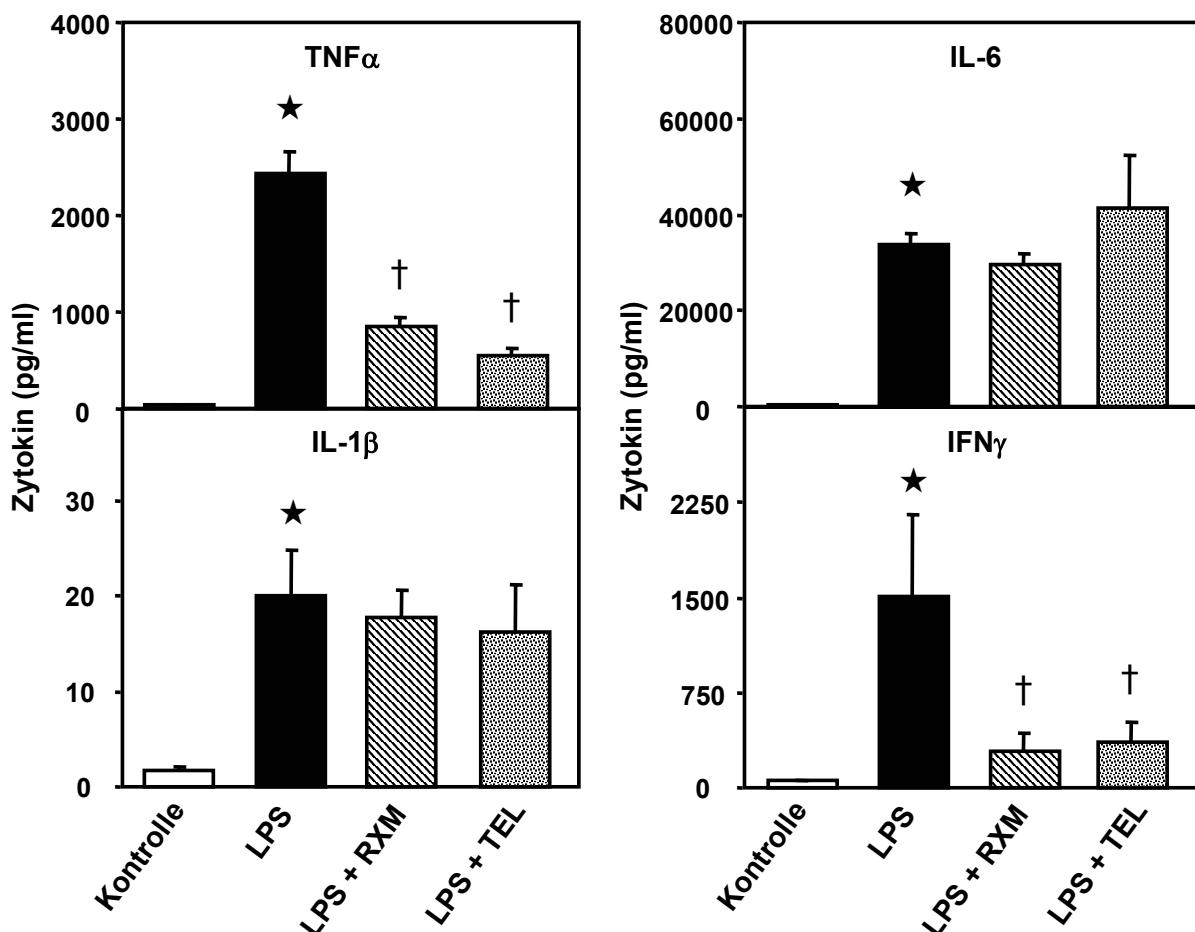


**Abb. 24: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in der Leber** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Gewebekonzentration der Zytokine wurde 2 h (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6) oder 6 h (IFN $\gamma$ ) nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt und auf die Menge an Gesamtprotein im Gewebe bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$  von ca. 24 pg/mg Protein auf ca. 13 bzw. 12 pg/mg Protein und von IFN $\gamma$  von ca. 24 pg/mg Protein auf ca. 11 bzw. 9 pg/mg Protein gesenkt. Die LPS-induzierte Bildung von IL-1 $\beta$  verringerte sich unter Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin von ca. 630 pg/mg Protein auf ca. 480 bzw. 440 pg/mg Protein, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen. Die durch LPS induzierte Expression von IL-6 blieb bei zusätzlicher Applikation von Roxithromycin oder Telithromycin unverändert.

#### Plasma:

Die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin verminderte nach LPS-Stimulation signifikant die Proteinbildung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  im Plasma (Abb. 25).



**Abb. 25: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  im Plasma.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Plasmakonzentration der Zytokine wurde 2 h (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6) oder 6 h (IFN $\gamma$ ) nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS.

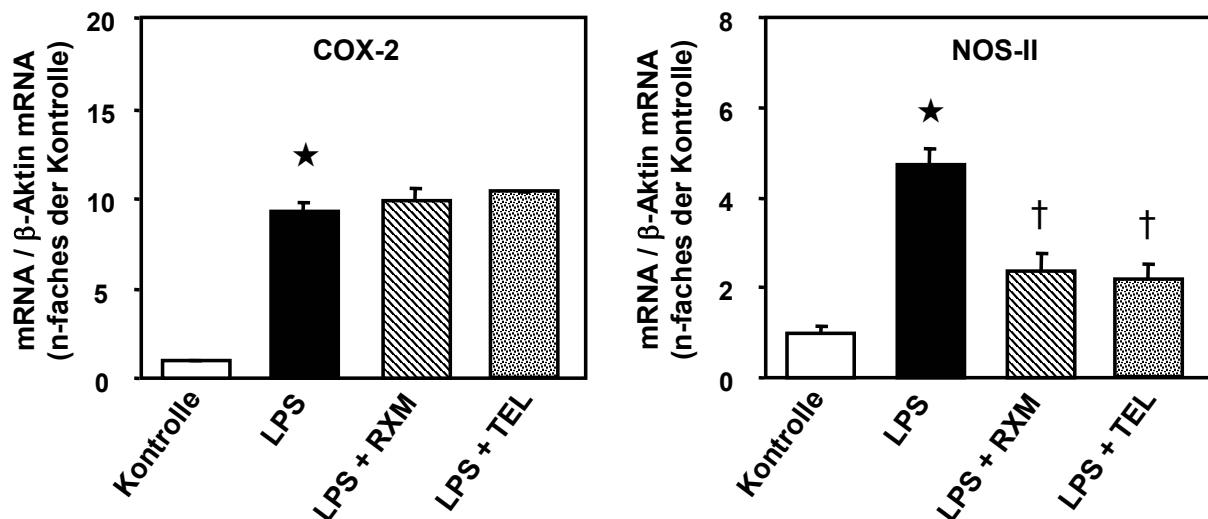
Unter dem Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$  von ca. 2450 pg/ml auf ca. 860 bzw. 550 pg/ml und von IFN $\gamma$  von ca. 1500 pg/ml auf ca. 280 bzw. 360 pg/ml gesenkt. Die LPS-induzierte Proteinbildung von IL-1 $\beta$  und IL-6 wurde bei zusätzlicher Applikation von Roxithromycin oder Telithromycin kaum beeinflusst.

### 5.2.2.3 Einfluss auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz

Aufgrund der verminderten Zytokin-Produktion unter dem Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin wurde auch die LPS-induzierte mRNA-Expression der induzierbaren Enzyme COX-2 und NOS-II nach intraperitonealer Gabe von LPS in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz untersucht.

#### Lunge:

Die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin führte in der Lunge nach LPS-Stimulation zur signifikant reduzierten mRNA-Expression der NOS-II (Abb. 26).



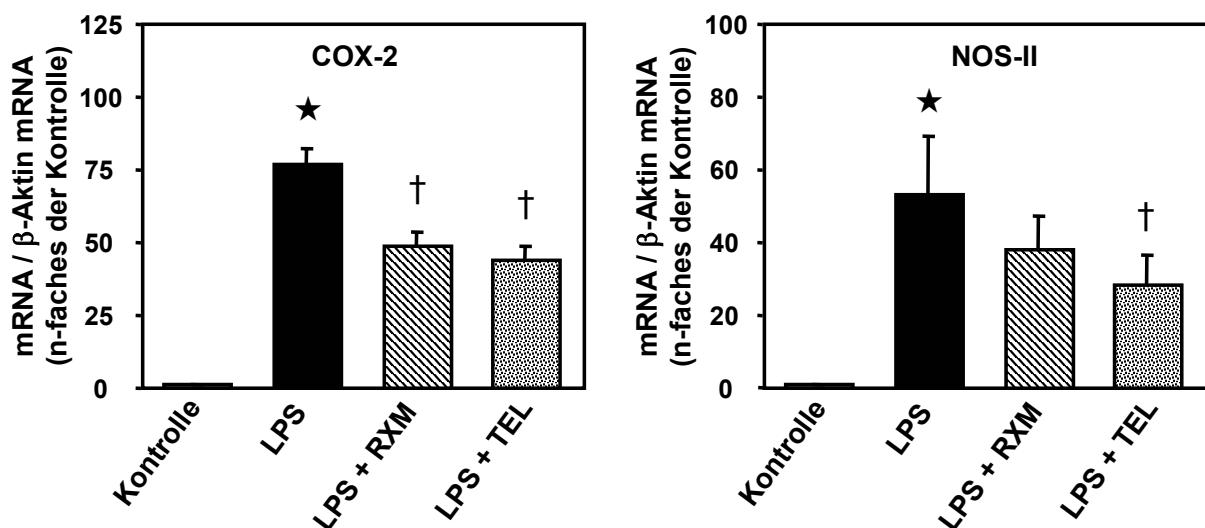
**Abb. 26: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II in der Lunge.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der COX-2 bzw. NOS-II mRNA wurde 2 h (COX-2) oder 6 h (NOS-II) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Durch die gleichzeitige Gabe von Roxithromycin bzw. Telithromycin verringerte sich die LPS-induzierte mRNA-Expression der NOS-II um 50 % bzw. 55 %. Die LPS-induzierte

Expression der COX-2 mRNA wurde unter Einfluss von Roxithromycin oder Telithromycin nicht verändert.

**Leber:**

Durch die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin kam es in der Leber nach LPS-Stimulation zur signifikant verminderten Expression der mRNA von COX-2 und NOS-II (Abb. 27).

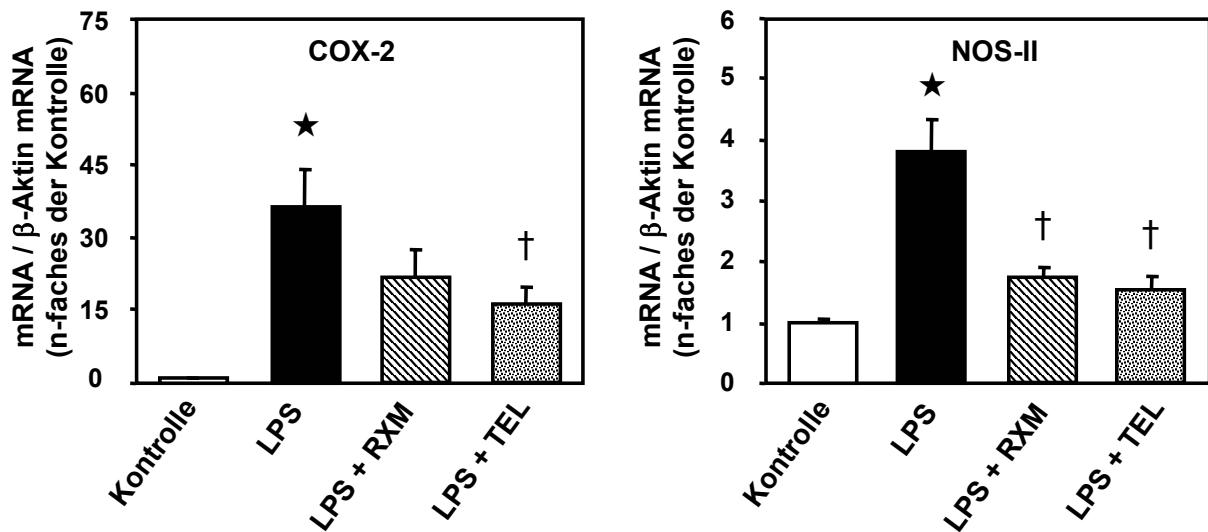


**Abb. 27: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II in der Leber.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der COX-2 bzw. NOS-II mRNA wurde 2 h (COX-2) oder 6 h (NOS-II) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; ★ p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Unter dem Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die LPS-induzierte mRNA-Expression der COX-2 um 36 % bzw. 48 % gesenkt. Die LPS-induzierte Expression der NOS-II mRNA verringerte sich bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin bzw. Telithromycin um 28 % bzw. 47 % verringert, erreichte jedoch nur in der Gruppe der mit Telithromycin behandelten Tiere eine statistische Signifikanz.

**Herz:**

Im Herzen führte die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin nach der Stimulation mit LPS zur signifikant reduzierten Induktion der mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II (Abb. 28).

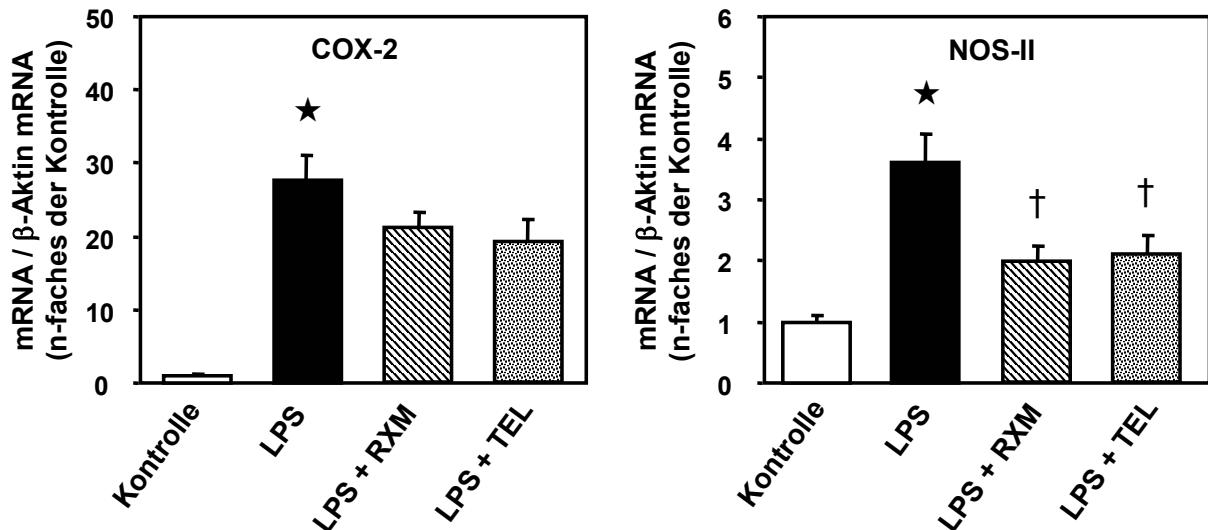


**Abb. 28: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II im Herzen.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der COX-2 bzw. NOS-II mRNA wurde 2 h (COX-2) oder 6 h (NOS-II) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Bei gleichzeitiger Applikation von Roxithromycin bzw. Telithromycin verminderte sich die LPS-induzierte mRNA-Expression der NOS-II um 54 % bzw. 60 %. Die LPS-induzierte Expression der COX-2 mRNA wurde unter Einfluss Roxithromycin bzw. Telithromycin um 40 % bzw. 56 % verringert, erreichte jedoch nur in der Gruppe der mit Telithromycin behandelten Tiere eine statistische Signifikanz.

**Niere:**

Die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin verringerte signifikant die Expression der NOS-II mRNA in der Niere nach Stimulation mit LPS (Abb. 29).

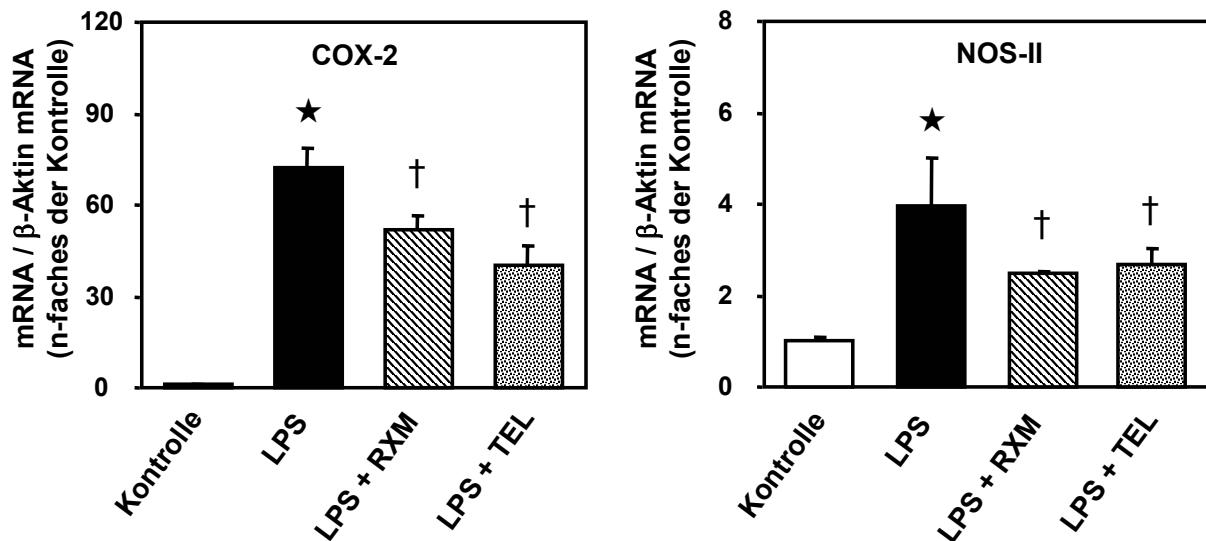


**Abb. 29: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II in der Niere.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der COX-2 bzw. NOS-II mRNA wurde 2 h (COX-2) oder 6 h (NOS-II) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Unter Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die LPS-induzierte mRNA-Expression der NOS-II um 45 % bzw. 42 % gesenkt. Die LPS-induzierte Expression der COX-2 mRNA wurde zwar bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin bzw. Telithromycin um 24 % bzw. 31 % vermindert, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen.

**Milz:**

Durch die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin kam es in der Milz nach Stimulation mit LPS zur signifikant reduzierten Expression der mRNA von COX-2 und NOS-II (Abb. 30).

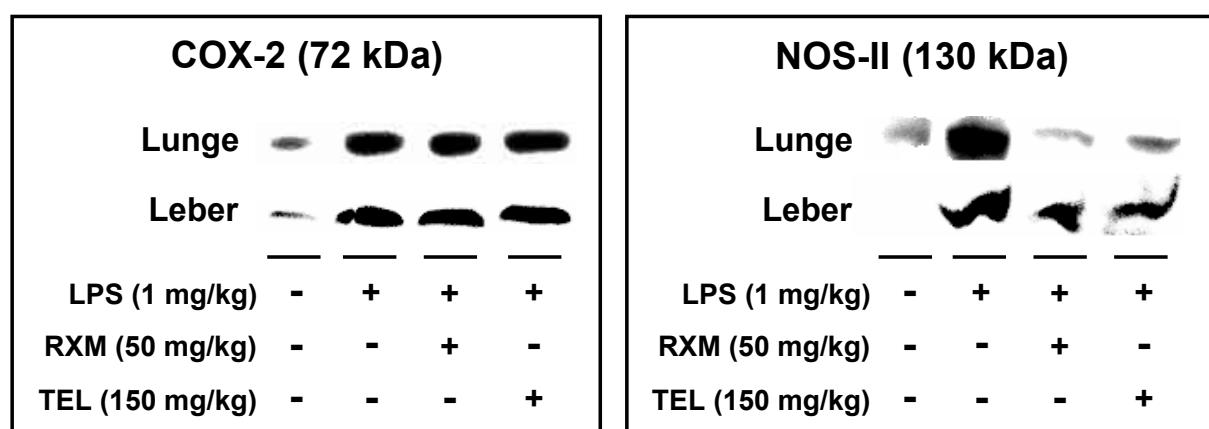


**Abb. 30: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von COX-2 und NOS-II in der Milz.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Abundanz der COX-2 bzw. NOS-II mRNA wurde 2 h (COX-2) oder 6 h (NOS-II) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von  $\beta$ -Aktin standardisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die LPS-induzierte mRNA-Expression der COX-2 um 29 % bzw. 45 % und die der NOS-II um 38 % bzw. 33 % gesenkt.

#### 5.2.2.4 Einfluss auf die LPS-induzierte Proteinexpression von COX-2 und NOS-II in Lunge und Leber

Zusätzlich zur mRNA-Expression wurde der Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auch auf die LPS-induzierte Proteinexpression der Enzyme COX-2 und NOS-II in Lunge und Leber untersucht. Durch die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin kam es in Lunge und Leber nach LPS-Stimulation zur geringfügig verminderten Proteinbildung von COX-2, aber zur deutlich reduzierten Bildung von NOS-II Protein (Abb. 31).



**Abb. 31: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Proteinexpression von COX-2 und NOS-II in Lunge und Leber.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Gewebekonzentration von COX-2 bzw. NOS-II Protein wurde 2 h (COX-2) oder 6 h (NOS-II) nach LPS-Applikation mittels Western Blot bestimmt.

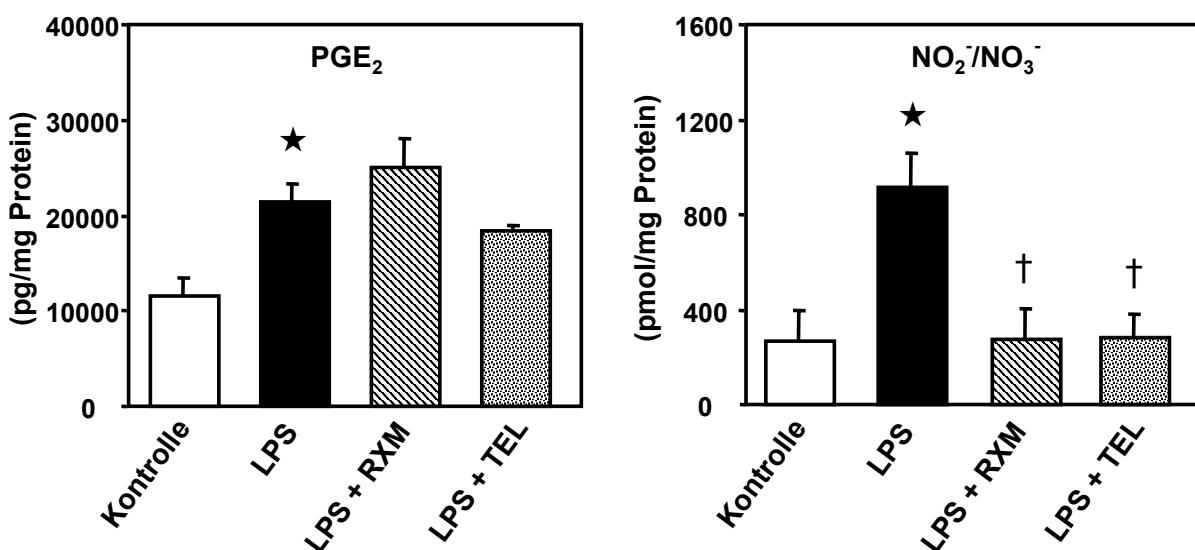
Die intraperitoneale Verabreichung von LPS führte zu einer sichtbaren Stimulation der Proteinexpression von COX-2 und NOS-II in Lunge und Leber. Unter dem Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin verändert sich die LPS-induzierte Expression der COX-2 weder in der Lunge noch in der Leber. Die LPS-induzierte Expression der NOS-II wurde bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin bzw. Telithromycin in der Lunge vollständig unterdrückt und in der Leber deutlich vermindert.

### 5.2.2.5 Einfluss auf die LPS-induzierte Bildung von Prostanoiden und die Entstehung von Stickstoffmonoxid in Lunge, Leber und Plasma

Es wurde der Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von Prostaglandinen (PG) und die Entstehung von Stickstoffmonoxid (NO) in Lunge, Leber und Plasma untersucht.

#### Lunge:

Durch die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin kam es in der Lunge nach der Stimulation mit LPS zur signifikant verringerten Bildung von  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  (Abb. 32).

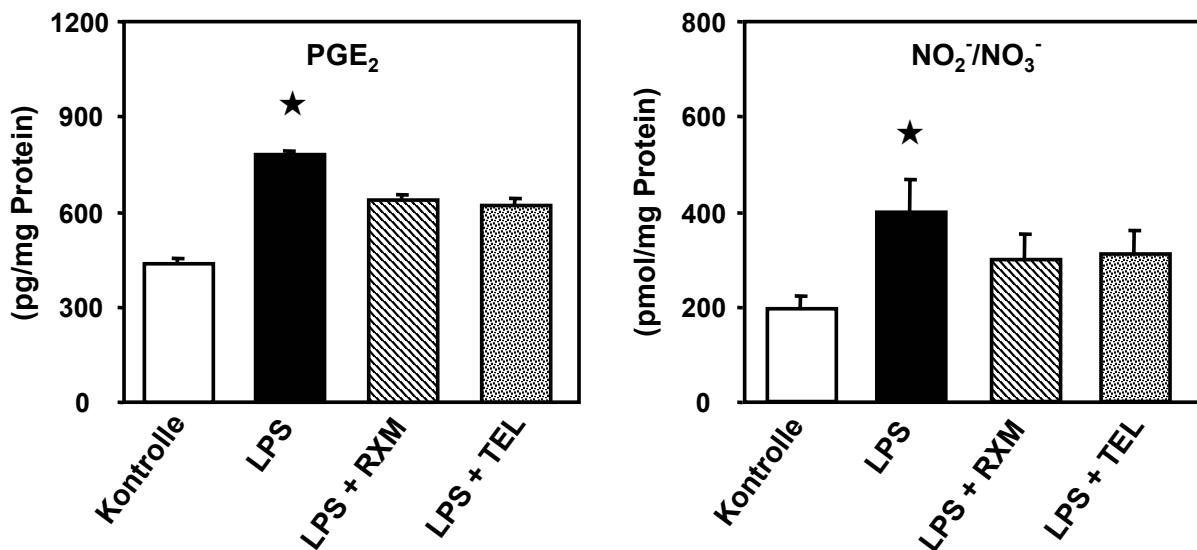


**Abb. 32: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von PGE<sub>2</sub> und NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in der Lunge.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Gewebekonzentration von PGE<sub>2</sub> wurde 2 h nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt. Die Messung der Gewebekonzentration von NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> erfolgte 6 h nach LPS-Applikation mithilfe colorimetrischer Assays. Die Konzentrationen wurden auf die Menge an Gesamtprotein im Gewebe standardisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Unter dem Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die LPS-induzierte Bildung von PGE<sub>2</sub> nicht bzw. nur geringfügig abgeschwächt. Die LPS-induzierte Bildung von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup> wurde bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin bzw. Telithromycin vollständig unterdrückt.

**Leber:**

In der Leber führte die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin nach LPS-Stimulation nur zur tendenziell verminderten Bildung von PGE<sub>2</sub> sowie NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Abb. 33).

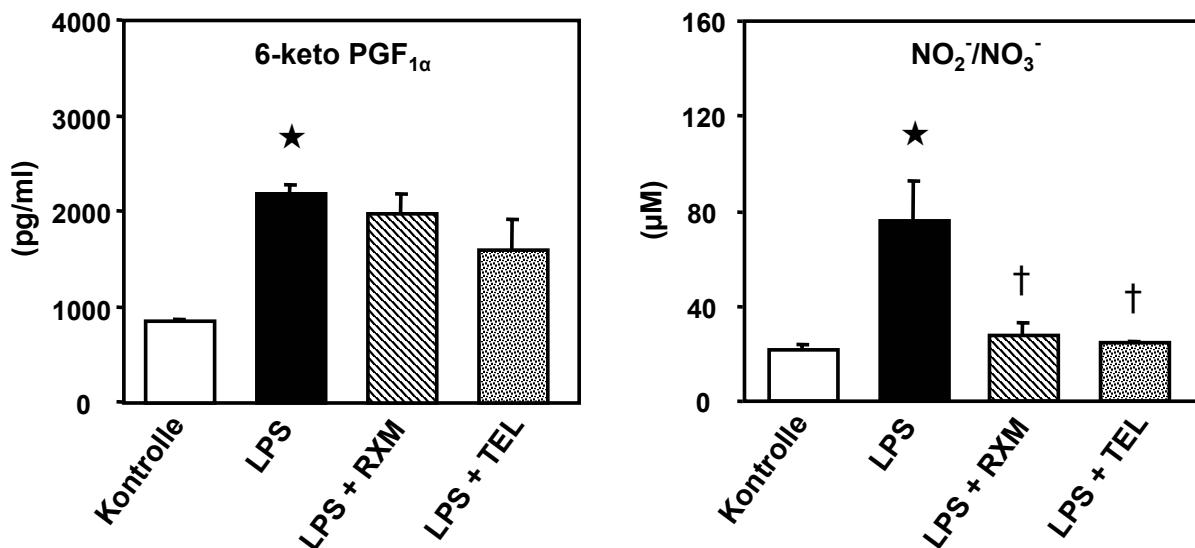


**Abb. 33: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von PGE<sub>2</sub> und NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in der Leber.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Gewebekonzentration von PGE<sub>2</sub> wurde 2 h nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt. Die Messung der Gewebekonzentration von NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> erfolgte 6 h nach LPS-Applikation mithilfe colorimetrischer Assays. Die Konzentrationen wurden auf die Menge an Gesamtprotein im Gewebe standardisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Die zusätzliche Applikation von Roxithromycin bzw. Telithromycin verminderte die LPS-induzierte Bildung von PGE<sub>2</sub> von etwa 780 pg/mg Protein auf jeweils ca. 630 pg/mg Protein, sowie die Bildung von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup> von ca. 400 pmol/mg Protein auf jeweils ca. 300 pmol/mg Protein, jedoch wurde in keiner der mit den Antibiotika behandelten Gruppen eine statistische Signifikanz erreicht.

**Plasma:**

Die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin verringerte die Entstehung von  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  im Plasma nach der Stimulation mit LPS signifikant (Abb. 34).



**Abb. 34: Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von 6-keto PGF<sub>1α</sub> und  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  im Plasma.** Die Mäuse wurden für 2 h durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Roxithromycin (RXM), 150 mg/kg Telithromycin (TEL) oder isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt und erhielten danach eine intraperitoneale Injektion von 1 mg/kg LPS bzw. isotoner Kochsalzlösung im Fall der Kontrolle. Die Bestimmung der Plasmakonzentration von 6-keto PGF<sub>1α</sub> erfolgte 2 h nach LPS-Applikation mittels ELISA. Die Messung der Plasmakonzentration von  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  wurde 6 h nach LPS-Applikation mithilfe colorimetrischer Assays bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

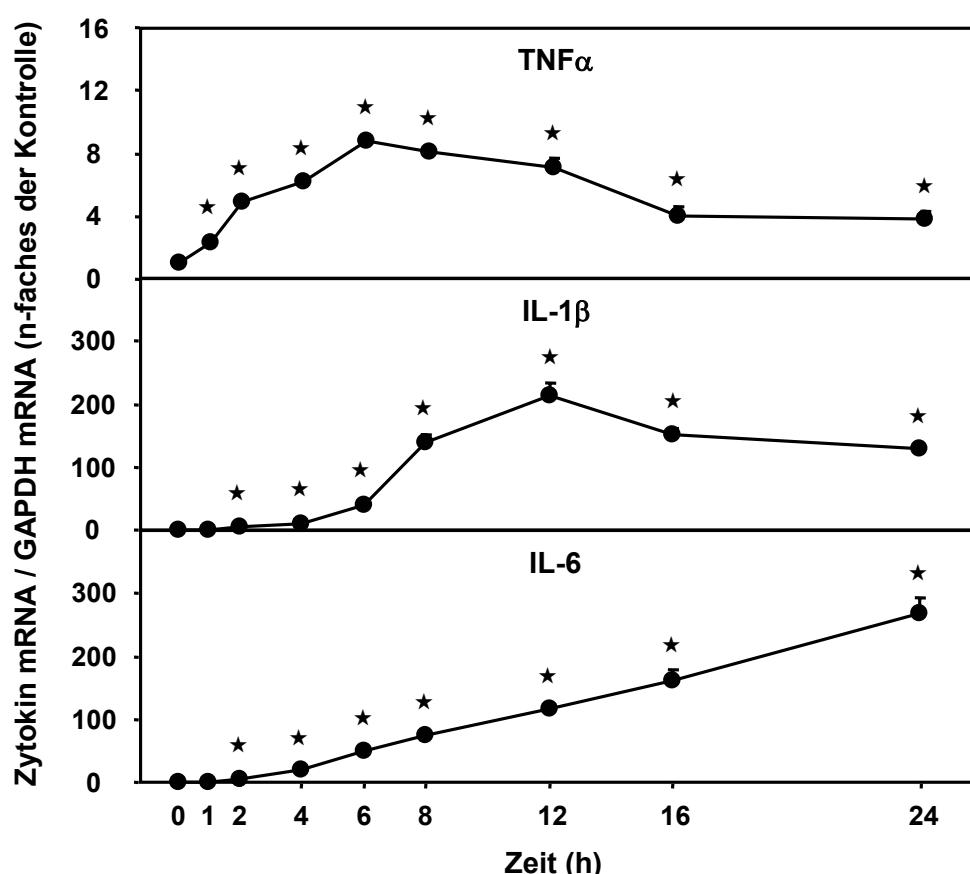
Die LPS-induzierte Entstehung von  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_3^-$  wurde bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin bzw. Telithromycin fast vollständig unterdrückt. Unter dem Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin wurde die LPS-induzierte Bildung von 6-keto PGF<sub>1α</sub> nur geringfügig von etwa 2250 pg/ml auf ca. 2000 pg/ml bzw. 1600 pg/ml gesenkt, wobei keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

## 5.3 Entzündungsreaktion in murinen Makrophagen

### 5.3.1 Einfluss einer Inkubation mit LPS auf die Bildung von Zytokinen

#### 5.3.1.1 mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und IL-6

Nach einer Stimulation mit LPS wurde die Expression der mRNA von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in J-774A.1 Makrophagen über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Die Inkubation mit LPS führte in Abhängigkeit von der Zeit zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 (Abb. 35).



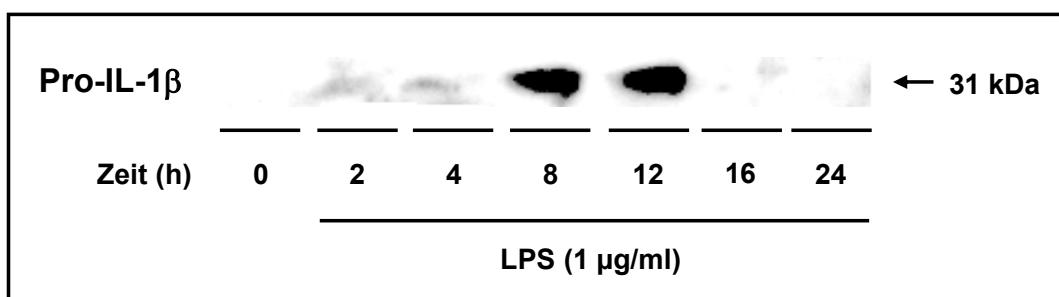
**Abb. 35: Zeitlicher Effekt von LPS auf die mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden mit 1  $\mu$ g/ml LPS über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Die Abundanz der Zytokin-mRNA wurde vor (0 h) sowie 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 24 h nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von GAPDH standardisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  Proben pro Gruppe; \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (0 h)

LPS führte bereits 1 h nach LPS-Applikation zu einer vermehrten Expression der TNF $\alpha$  mRNA, die über den gesamten Zeitraum von 24 h anhielt; die maximale Stimulation wurde

6 h nach LPS-Applikation erreicht. Die Expression der mRNA von IL-1 $\beta$  war ab dem Zeitpunkt 2 h bis 24 h nach LPS-Applikation erhöht, wobei die maximale Stimulation 12 h nach LPS-Applikation erreicht wurde. Die Expression der IL-6 mRNA wurde ab dem Zeitpunkt 2 h bis 24 h nach LPS-Applikation stetig gesteigert.

### 5.3.1.2 Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$

Die Proteinbildung von Pro-IL-1 $\beta$  wurde nach der Stimulation mit LPS in J-774A.1 Makrophagen ebenfalls über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Nach der Inkubation von J-774A.1 Makrophagen mit LPS kam es in Abhängigkeit von der Zeit zu einer deutlich gesteigerten Bildung von Pro-IL-1 $\beta$  (Abb. 36).



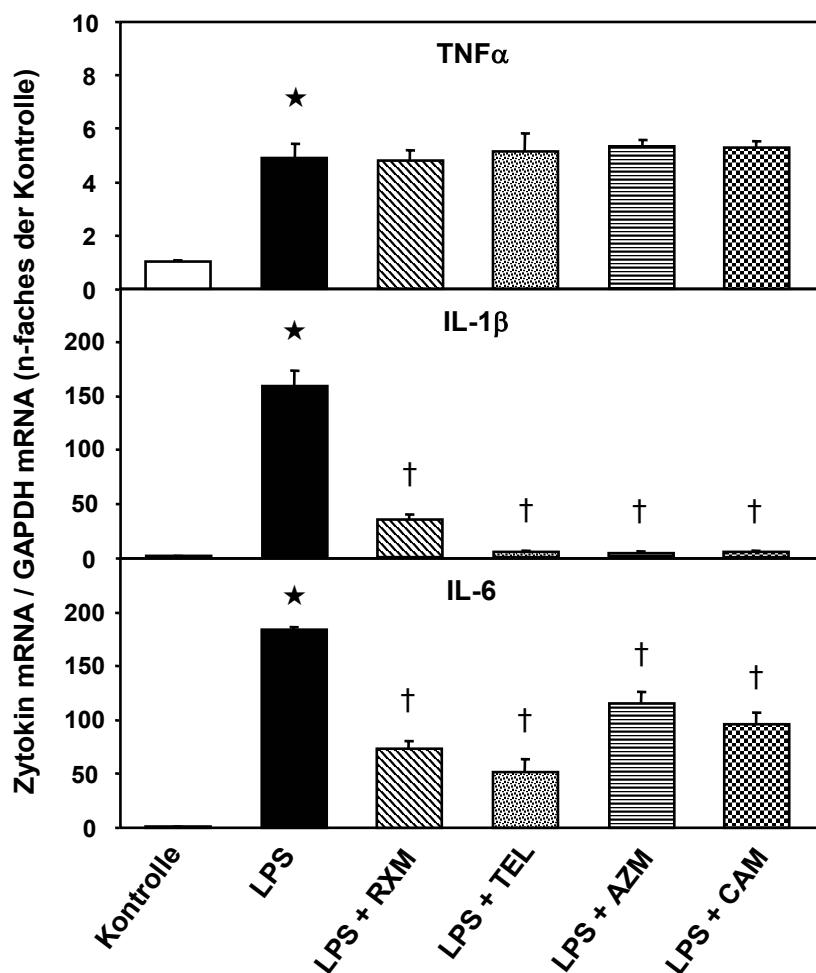
**Abb. 36: Zeitlicher Effekt von LPS auf die Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$  in J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden mit 1  $\mu$ g/ml LPS über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Die Anwesenheit von Pro-IL-1 $\beta$  wurde vor (0 h) sowie 2, 4, 8, 12, 16 und 24 h nach LPS-Applikation mittels Western Blot bestimmt.

LPS führte bereits 2 h nach LPS-Applikation zu einer sichtbaren Stimulation der Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$ , die bei 8 h bis 12 h ein Maximum erreichte und danach rasch wieder abnahm.

### 5.3.2 Einfluss von Makroliden und des Ketolids Telithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von Zytokinen

#### 5.3.2.1 Einfluss auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und IL-6

Der Einfluss der Antibiotika Roxithromycin, Telithromycin Azithromycin und Clarithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression der Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , und IL-6 wurde in J-774A.1 Makrophagen untersucht. Die Vorinkubation der Zellen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin oder Clarithromycin führte nach Stimulation mit LPS zur signifikant reduzierten mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  und IL-6 (Abb. 37).

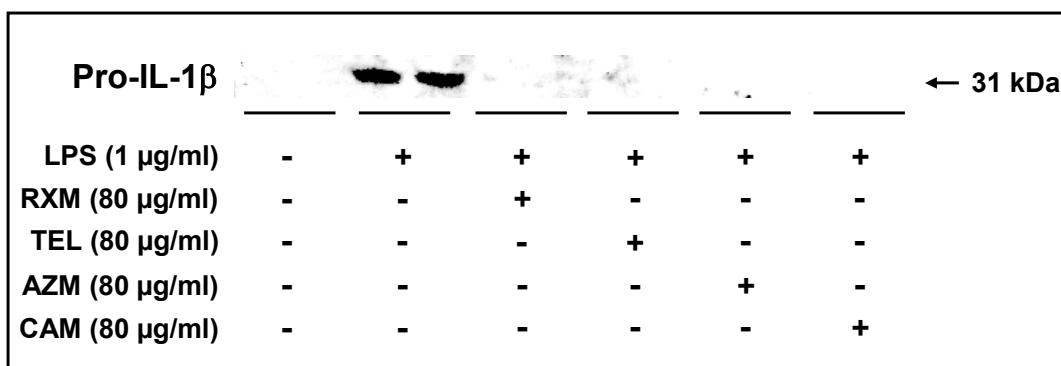


**Abb. 37: Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , und IL-6 in J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden für 1 h mit 80  $\mu$ g/ml Roxithromycin (RXM), Telithromycin (TEL), Azithromycin (AZM) oder Clarithromycin (CAM) vorinkubiert und danach mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Die Abundanz der Zytokin-mRNA wurde 8 h (TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) oder 24 h (IL-6) nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils auf die mRNA von GAPDH standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 4 Proben pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. LPS, † p < 0,05 vs. Kontrolle.

Unter Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin Azithromycin bzw. Clarithromycin wurde die LPS-induzierte Bildung der mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  um 78 %, 97 %, 98 % bzw. 98 % und von IL-6 um 60 %, 72 %, 37 % bzw. 48 % gesenkt. Die LPS-induzierte Expression der TNF $\alpha$  mRNA blieb bei gleichzeitiger Gabe von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin oder Clarithromycin unverändert.

### 5.3.2.2 Einfluss auf die LPS-induzierte Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$

Nachfolgend wurde auch der Einfluss der Antibiotika Roxithromycin, Telithromycin Azithromycin und Clarithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von Pro-IL-1 $\beta$  in J-774A.1 Makrophagen untersucht. Durch die Vorinkubation der Zellen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin oder Clarithromycin kam es nach LPS-Stimulation zur deutlich sichtbaren Hemmung der Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$  (Abb. 38).



**Abb. 38: Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin auf die LPS-induzierte Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$  in J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden für 1 h mit 80  $\mu$ g/ml Roxithromycin (RXM), Telithromycin (TEL), Azithromycin (AZM) oder Clarithromycin (CAM) vorinkubiert und danach mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Die Anwesenheit von Pro-IL-1 $\beta$  wurde 10 h nach LPS-Applikation mittels Western Blot bestimmt.

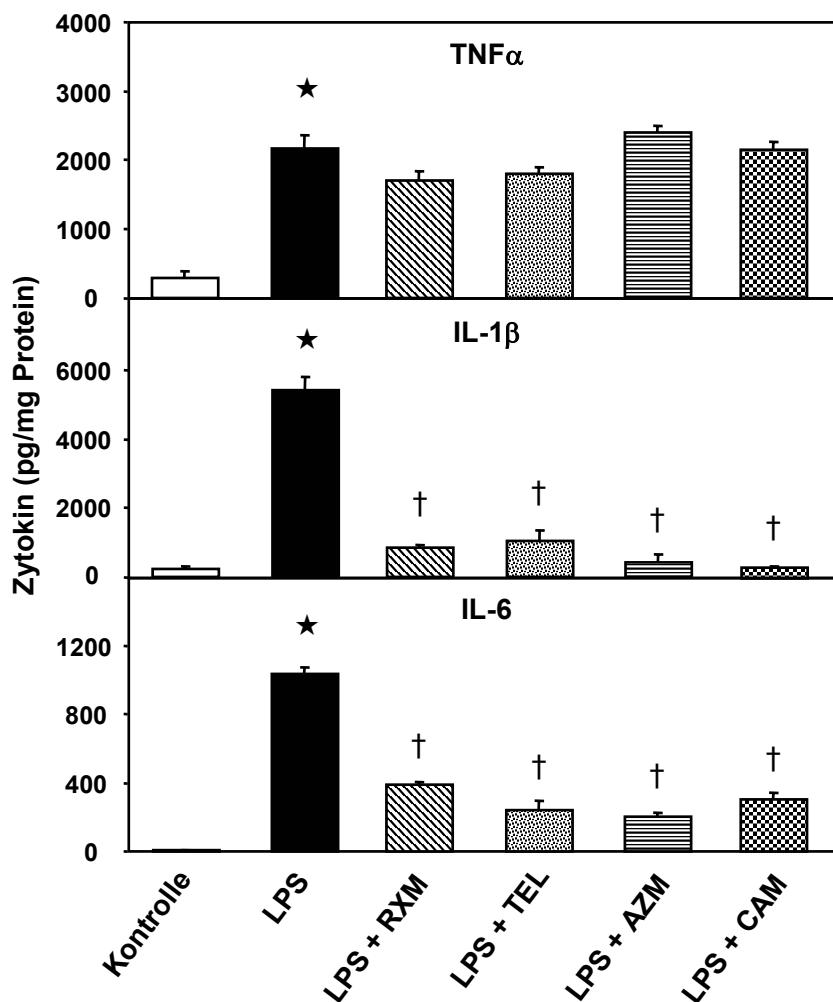
Unter Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin Azithromycin bzw. Clarithromycin wurde die LPS-induzierte Bildung von Pro-IL-1 $\beta$  vollständig unterdrückt.

### 5.3.2.3 Einfluss auf die LPS-induzierte Proteinbildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und IL-6

Der Einfluss der Antibiotika Roxithromycin, Telithromycin Azithromycin und Clarithromycin auf die LPS-induzierte Bildung bzw. Freisetzung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , und IL-6 wurde im Zellextrakt bzw. im Medium von J-774A.1 Makrophagen untersucht.

**Zellextrakt:**

Durch die Vorinkubation der Zellen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin oder Clarithromycin wurde die Proteinbildung von IL-1 $\beta$  und IL-6 im Zellextrakt nach der Stimulation mit LPS signifikant vermindert (Abb. 39).

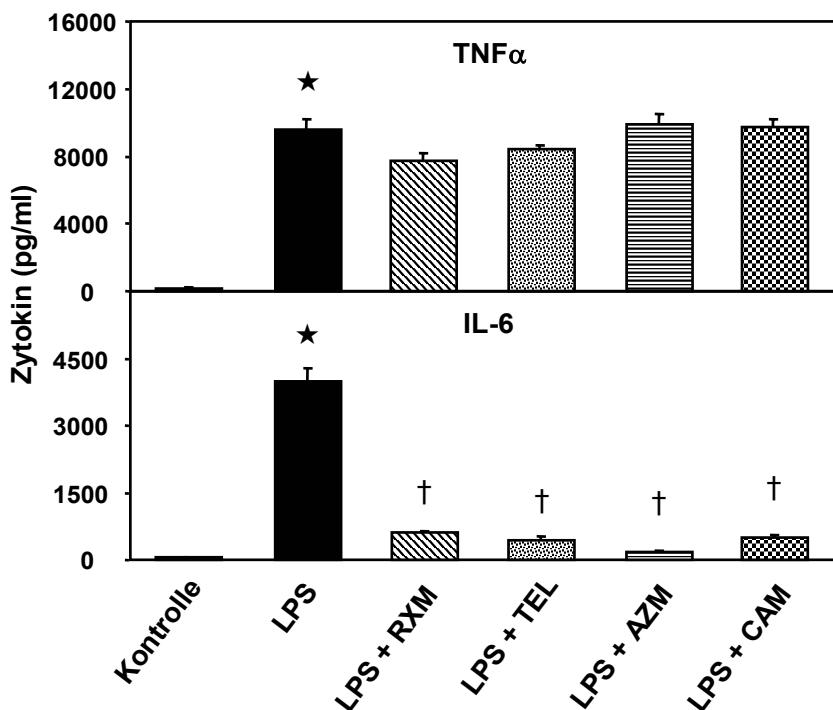


**Abb. 39: Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , und IL-6 im Zellextrakt von J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden für 1 h mit 80  $\mu$ g/ml Roxithromycin (RXM), Telithromycin (TEL), Azithromycin (AZM) oder Clarithromycin (CAM) vorinkubiert und danach mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Die Konzentration von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 im Zellextrakt wurde 24 h nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt und auf die Menge an Gesamtprotein im Extrakt bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4$  Proben pro Gruppe; \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, †  $p < 0,05$  vs. LPS

Unter Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin bzw. Clarithromycin wurde die LPS-induzierte Bildung von IL-1 $\beta$  von ca. 5400 pg/mg Protein auf ca. 870, 1050, 410 bzw. 310 pg/mg Protein und die Bildung von IL-6 von ca. 1000 pg/mg Protein auf ca. 380, 240, 200 bzw. 300 pg/mg Protein gesenkt. Die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$  blieb bei gleichzeitiger Applikation von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin oder Clarithromycin unverändert.

**Medium:**

Die Vorinkubation der Makrophagen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin oder Clarithromycin führte nach LPS-Stimulation zur signifikant verringerten Anwesenheit von IL-6 Protein im Zellmedium (Abb. 40).



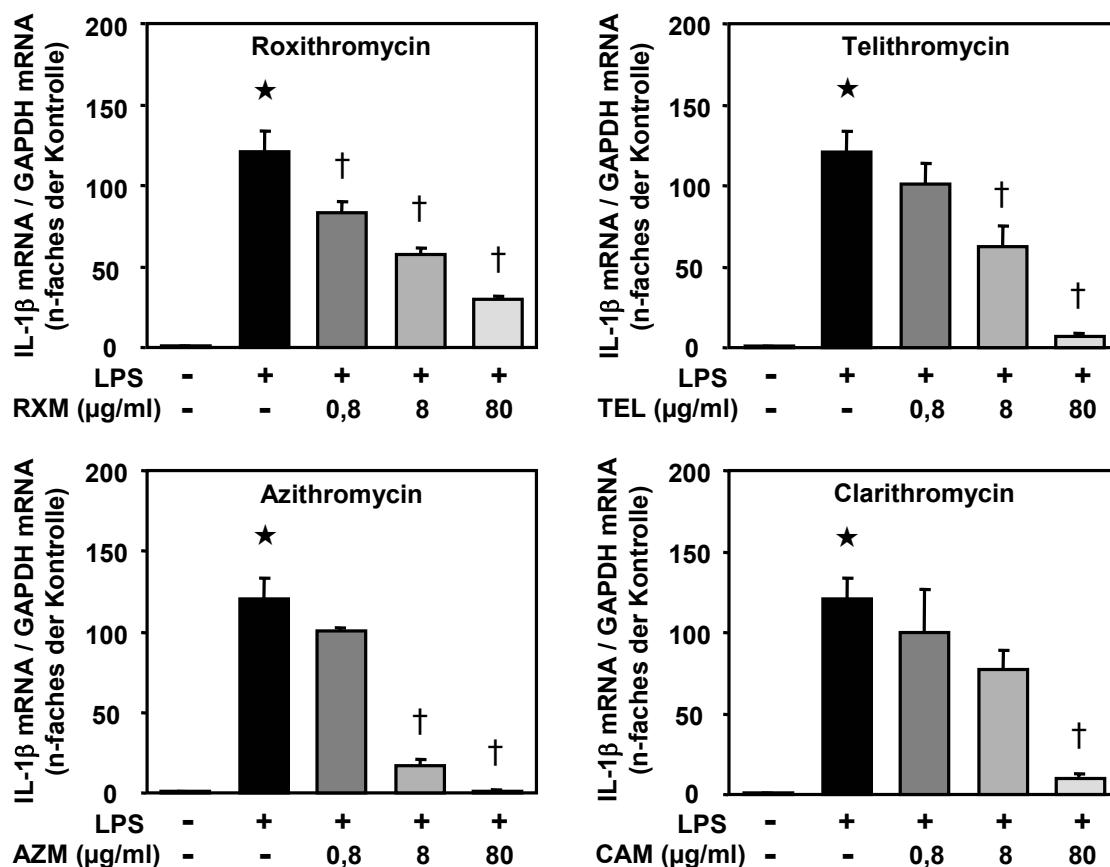
**Abb. 40: Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin auf die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$  und IL-6 im Zellmedium von J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden für 1 h mit 80  $\mu$ g/ml Roxithromycin (RXM), Telithromycin (TEL), Azithromycin (AZM) oder Clarithromycin (CAM) vorinkubiert und danach mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Die Konzentration von TNF $\alpha$  und IL-6 im Zellmedium wurde 24 h nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 4 Proben pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Bei gleichzeitiger Applikation von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin bzw. Clarithromycin wurde die LPS-induzierte Anwesenheit von IL-6 Protein von ca. 4000 pg/ml auf ca. 610, 450, 180 bzw. 480 pg/ml gesenkt. Die LPS-induzierte Anwesenheit von TNF $\alpha$  veränderte sich unter Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin oder Clarithromycin kaum.

Bei der Bestimmung von IL- $\beta$  im Zellmedium wurden keine Werte erhalten. Möglicherweise wurde IL-1 $\beta$  von J-774A.1 Makrophagen nicht ins Medium abgegeben.

### 5.3.2.4 Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$

Die Vorbehandlung der J-774A.1 Makrophagen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin oder Clarithromycin verminderte die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  (vgl. Abb. 37), woraufhin von allen Antibiotika Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für die LPS-induzierte Expression der IL-1 $\beta$  mRNA erstellt wurden. Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin bzw. Clarithromycin verringerten die LPS-induzierte Expression der IL-1 $\beta$  mRNA signifikant in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration (Abb. 41).



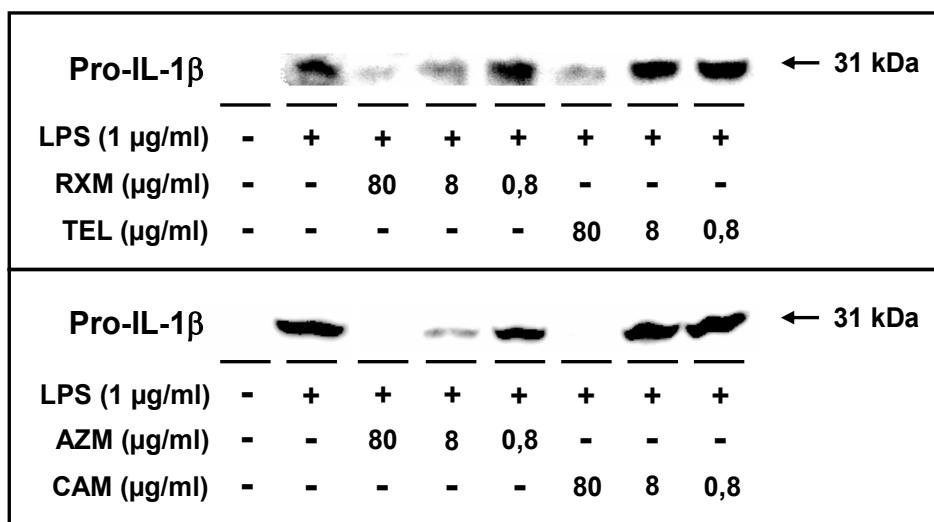
**Abb. 41: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin für die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  in J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden für 1 h mit 0,8 µg/ml, 8 µg/ml und 80 µg/ml Roxithromycin (RXM), Telithromycin (TEL), Azithromycin (AZM) oder Clarithromycin (CAM) vorinkubiert und danach mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die Abundanz der IL-1 $\beta$  mRNA wurde 8 h nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und auf die mRNA von GAPDH standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 3 Proben pro Gruppe; ★ p < 0,05 vs. Kontrolle, † p < 0,05 vs. LPS

Der Einsatz von Roxithromycin bewirkte bei Verwendung zunehmender Konzentrationen von 0,8 µg/ml, 8 µg/ml bzw. 80 µg/ml eine Senkung der LPS-induzierten Expression der IL-1 $\beta$  mRNA um 31 %, 53 % bzw. 76 %. Telithromycin und Azithromycin führten bei Verwendung

steigender Konzentrationen von jeweils 0,8 µg/ml, 8 µg/ml und 80 µg/ml nach LPS-Stimulation zu einer verminderten Induktion der IL-1 $\beta$  mRNA um 17 %, 48 % und 94 % bzw. 16 %, 86 % und 99 %, wobei nur bei Einsatz einer Konzentration von jeweils 8 µg/ml und 80 µg/ml Signifikanz erreicht wurde. Clarithromycin verringerte nur bei Verwendung der höchsten Konzentration von 80 µg/ml die LPS-induzierte Expression von IL-1 $\beta$  um 91 %. Bei Verwendung der niedrigeren Konzentrationen war jedoch eine deutliche Tendenz zur verminderten mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  durch LPS sichtbar.

### 5.3.2.5 Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die LPS-induzierte Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$

Die Vorbehandlung von J-774A.1 Makrophagen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin oder Clarithromycin verminderte die LPS-induzierte Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$  (vgl. Abb. 38). Daher wurden von allen Antibiotika Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für die LPS-induzierte Bildung von Pro-IL-1 $\beta$  erstellt. Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin bzw. Clarithromycin verminderten die LPS-induzierte Bildung von Pro-IL-1 $\beta$  in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration (Abb. 42).



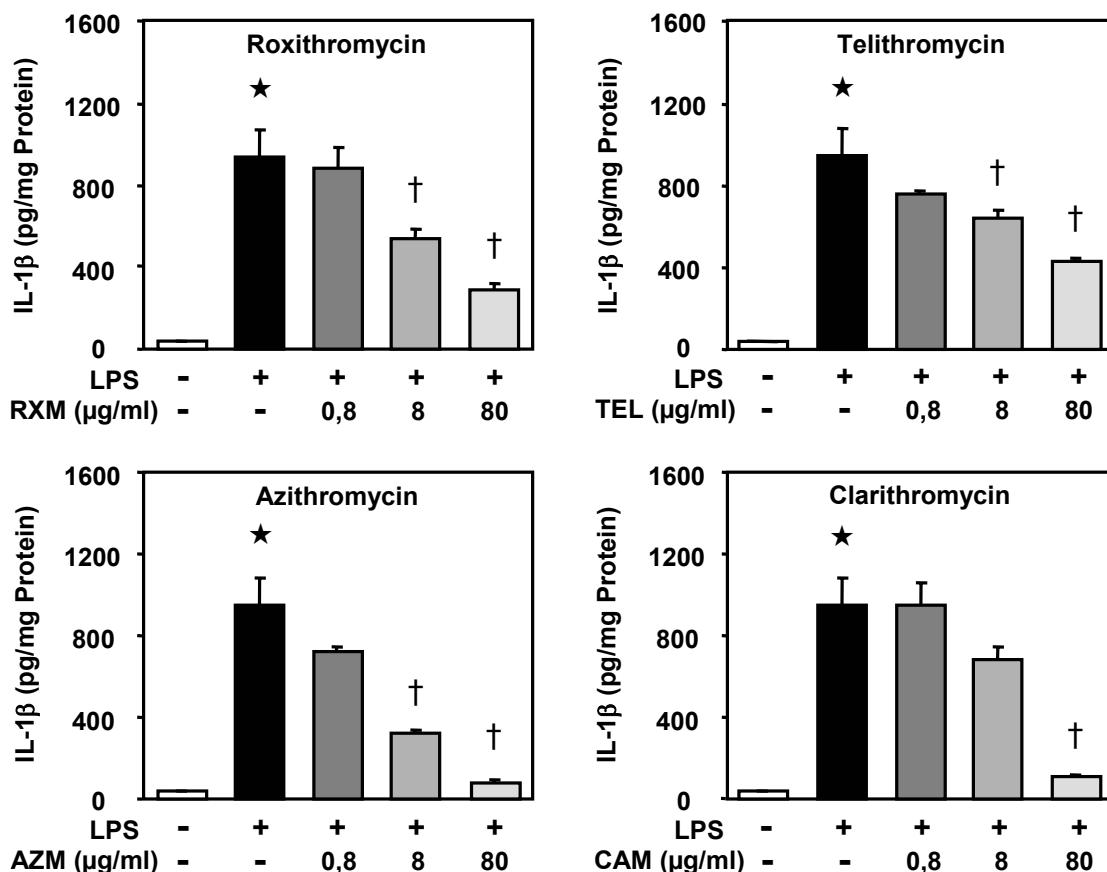
**Abb. 42: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin für die Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$  nach Induktion mit LPS in J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden für 1 h mit 0,8 µg/ml, 8 µg/ml und 80 µg/ml Roxithromycin (RXM), Telithromycin (TEL), Azithromycin (AZM) oder Clarithromycin (CAM) vorinkubiert und danach mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die Anwesenheit von Pro-IL-1 $\beta$  wurde 10 h nach LPS-Applikation mittels Western Blot bestimmt.

Bei Verwendung der höchsten Konzentration von 80 µg/ml hemmten alle eingesetzten Antibiotika die LPS-induzierte Expression von Pro-IL-1 $\beta$  fast vollständig. Der Einsatz einer Konzentration von 8 mg/ml führte nur bei Roxithromycin und Azithromycin nach der

Stimulation mit LPS zu einer deutlich sichtbaren Verminderung der Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$ . Die niedrigste Konzentration von 0,8  $\mu$ g/ml verringerte die LPS-induzierte Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$  kaum bzw. gar nicht.

### 5.3.2.6 Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die LPS-induzierte Bildung von IL-1 $\beta$

Die Vorbehandlung von J-774A.1 Makrophagen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin oder Clarithromycin führte nach LPS-Stimulation auch zur verringerten Proteinbildung von IL-1 $\beta$  im Zellextrakt (vgl. Abb. 39), woraufhin von allen Antibiotika Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für die LPS-induzierten Proteinbildung von IL-1 $\beta$  erstellt wurden. Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin bzw. Clarithromycin verminderten die LPS-induzierte Proteinbildung von IL-1 $\beta$  im Zellextrakt signifikant in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration (Abb. 43).



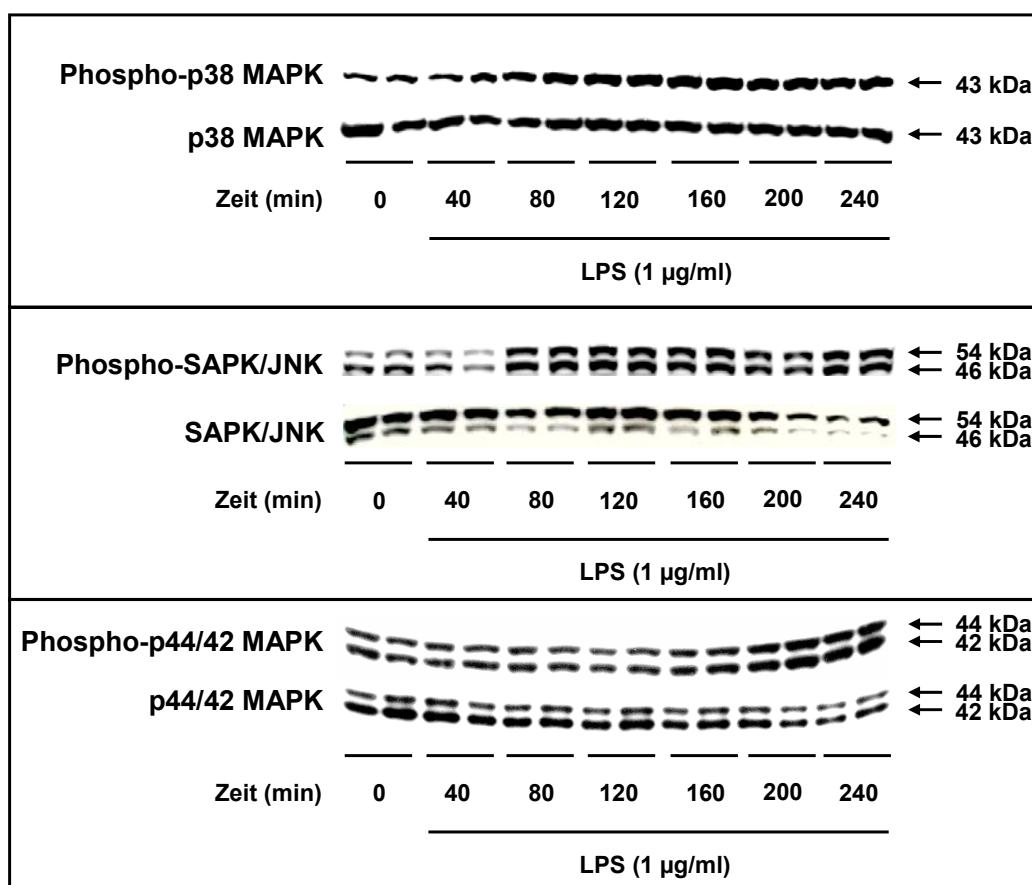
**Abb. 43: Konzentrations-Wirkungbeziehungen von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin für die LPS-induzierte Bildung von IL-1 $\beta$  im Zellextrakt von J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden für 1 h mit 0,8  $\mu$ g/ml, 8  $\mu$ g/ml und 80  $\mu$ g/ml Roxithromycin (RXM), Telithromycin (TEL), Azithromycin (AZM) oder Clarithromycin (CAM) vorinkubiert und danach mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Die Konzentration von IL-1 $\beta$  im Zellextrakt wurde 24 h nach LPS-Applikation mittels ELISA bestimmt und auf die Menge an Gesamtprotein im Extrakt bezogen. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4$  Proben pro Gruppe; ★  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, †  $p < 0,05$  vs. LPS

Der Einsatz von Roxithromycin, Telithromycin bzw. Azithromycin führte bei Verwendung zunehmender Konzentrationen von jeweils 0,8 µg/ml, 8 µg/ml und 80 µg/ml nach LPS-Stimulation zur Verminderung der LPS-induzierten IL-1 $\beta$  Proteinbildung von ca. 950 pg/mg Protein auf ca. 890, 540 und 290 pg/mg Protein (Roxithromycin) bzw. auf ca. 760, 640 und 430 pg/mg Protein (Telithromycin) bzw. auf ca. 720, 320 und 80 pg/mg Protein (Azithromycin), wobei nur bei Einsatz von jeweils 8 µg/ml bzw. 80 µg/ml Signifikanz erreicht wurde. Clarithromycin verringerte nur bei Verwendung der höchsten Konzentration von 80 µg/ml die LPS-induzierte Proteinbildung von IL-1 $\beta$  von 950 pg/mg Protein auf ca. 110 pg/mg Protein, jedoch ist auch bei Verwendung einer Konzentration von 8 µg/ml eine deutliche Tendenz zur verminderten Bildung von IL-1 $\beta$  nach LPS-Stimulation zu erkennen.

### 5.3.3 Bedeutung der MAP-Kinase-Signaltransduktionswege bei der LPS-induzierten Expression der IL-1 $\beta$ mRNA

#### 5.3.3.1 Einfluss einer Inkubation mit LPS auf die Aktivierung von MAP-Kinasen

Die Aktivierung der p38 MAP-Kinase, SAPK/JNK und p44/42 MAP-Kinase infolge der Inkubation mit LPS wurde in J-774A.1 Makrophagen über einen Zeitraum von 240 min untersucht. Dazu wurde der Phosphorylierungsstatus der einzelnen MAP-Kinasen ermittelt. Während der Inkubation der Zellen mit LPS kam es zur gesteigerten Phosphorylierung aller drei untersuchten MAP-Kinasen (Abb. 44).



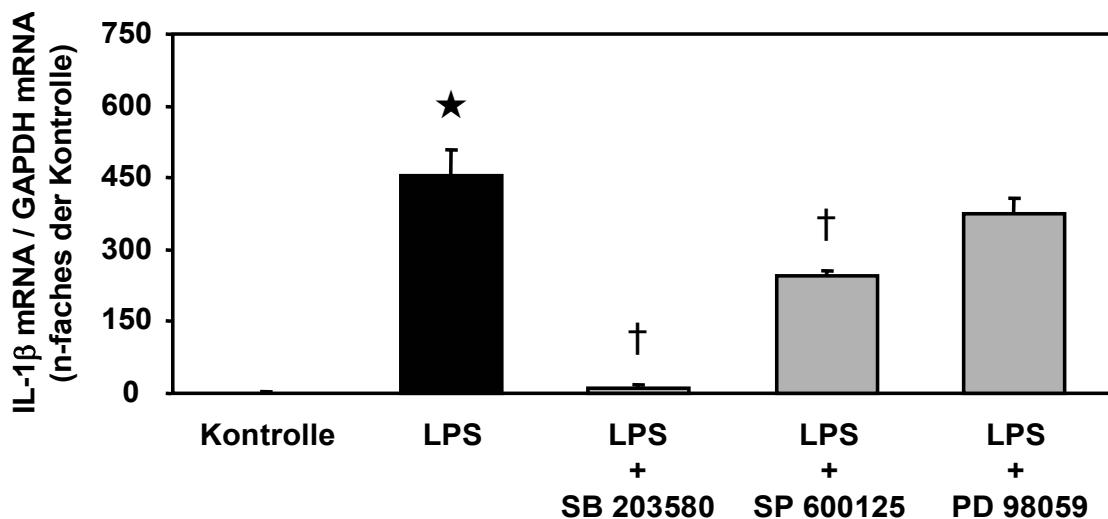
**Abb. 44: Zeitlicher Effekt von LPS auf die Phosphorylierung der p38 MAPK, SAPK/JNK und p44/42 MAPK in J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden mit 1 µg/ml LPS über einen Zeitraum von 240 min inkubiert. Die Anwesenheit der p38 MAPK, SAPK/JNK und p44/42 MAPK sowie jeweils deren phosphorylierte Form wurde vor (0 min) sowie 40, 80, 120, 160, 200 und 240 min nach LPS-Applikation mittels Western Blot bestimmt.

Die Stimulation mit LPS führte nach 80 min zu einer sichtlich gesteigerten Bildung der phospho-p38 MAPK, die nach ca. 160 min maximal wurde. Die nicht phosphorylierte Form der p38 MAPK blieb während der Inkubation mit LPS unverändert. LPS bewirkte nach

80 min einen deutlich sichtbaren Anstieg der phospho-SAPK/JNK, der bis zum Zeitpunkt 240 min nach LPS-Applikation anhielt. Die Anwesenheit der nicht phosphorylierten Form der SAPK/JNK nahm während der Stimulation mit LPS nach ca. 200 min etwas ab. Die Inkubation mit LPS steigerte auch die Anwesenheit der phospho-p44/42 MAPK ab dem Zeitpunkt 160 min nach LPS-Applikation. Zeitgleich nahm die Anwesenheit der nicht phosphorylierten Form der p44/42 MAPK geringfügig ab.

### 5.3.3.2 Einfluss selektiver Inhibitoren der MAP-Kinasen auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$

Es wurde der Einfluss selektiver Inhibitoren der einzelnen MAP-Kinasen auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  in J774A.1 Makrophagen untersucht. Die Aktivierung der p38 MAPK wurde durch den Einsatz von SB 203580, die der SAPK/JNK durch den Einsatz von SP 600125 und die der p44/42 MAPK durch den Einsatz von PD 98059 gehemmt. Die Hemmung der Aktivierung der p38 MAPK und SAPK/JNK mit SB 203580 bzw. SP 600125 führte nach Stimulation mit LPS zur signifikant verringerten mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  (Abb. 45).

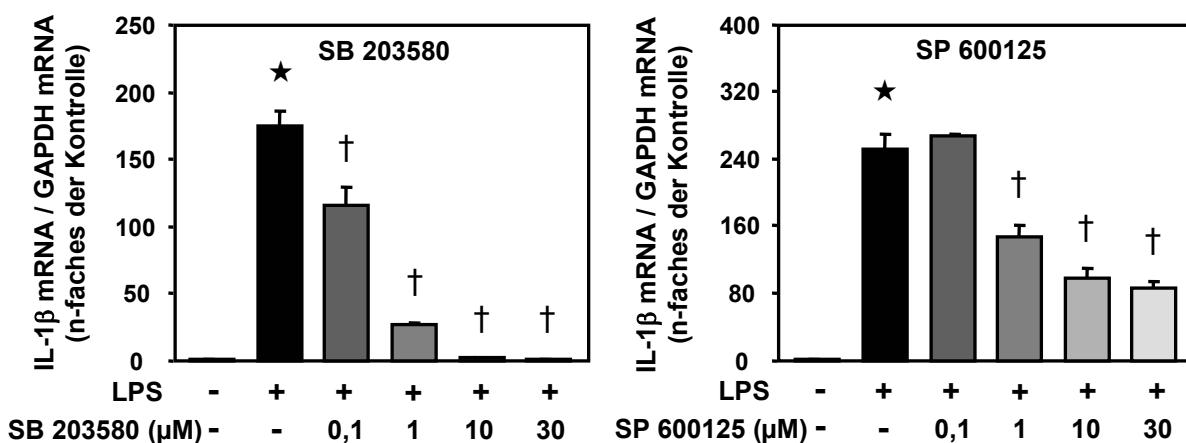


**Abb. 45: Einfluss von SB 203580, SP 600125 und PD 98059 auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  in J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden für 30 min mit jeweils 30  $\mu$ M SB 203580, SP 600125 oder PD 98059 vorinkubiert und danach mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Die Abundanz der IL-1 $\beta$  mRNA wurde 8 h nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und auf die mRNA von GAPDH standardisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4$  Proben pro Gruppe;  $\star p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $\dagger p < 0,05$  vs. LPS

Die Vorbehandlung der Zellen mit SB 203580 bzw. SP 600125 verminderte die LPS-induzierte Bildung der IL-1 $\beta$  mRNA um 97 % bzw. 46 %. Dagegen wurde die LPS-induzierte Expression der IL-1 $\beta$  mRNA bei gleichzeitiger Applikation von PD 98059 nur geringfügig und nicht signifikant reduziert.

### 5.3.3.3 Konzentrations-Wirkungsbeziehung der MAPK-Inhibitoren SB 203580 und SP 600125 für die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$

Die Vorbehandlung von J-774A.1 Makrophagen mit den MAP-Kinase-Inhibitoren SB 203580 oder SP 600125 verminderte die LPS-induzierte Expression der IL-1 $\beta$  mRNA (vgl. Abb. 45). Daher wurden von beiden Inhibitoren Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  erstellt. Die Vorbehandlung der Zellen mit SB 203580 und SP 600125 verminderte die LPS-induzierte Expression von IL-1 $\beta$  signifikant in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration (Abb. 46).

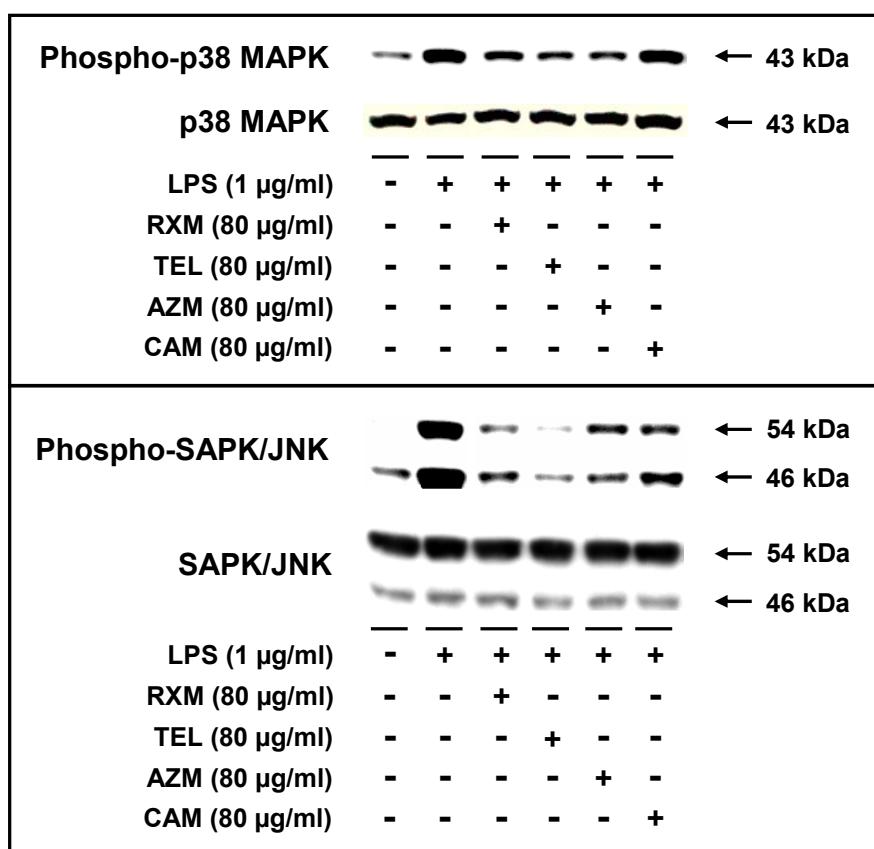


**Abb. 46: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von SB 203580 und SP 600125 für die LPS-induzierte Expression der IL-1 $\beta$  mRNA in J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen für 30 min mit jeweils 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M SB 203580 bzw. SP 600125 vorinkubiert und danach mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Die Abundanz der IL-1 $\beta$  mRNA wurde 8 h nach LPS-Applikation mittels Realtime RT-PCR bestimmt und jeweils gegen die mRNA von GAPDH standardisiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  Proben pro Gruppe; \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, †  $p < 0,05$  vs. LPS

Der Einsatz von SB 203580 bewirkte bei Verwendung zunehmender Konzentrationen von 0,1  $\mu$ M bis 30  $\mu$ M eine Verringerung der LPS-induzierten IL-1 $\beta$  mRNA-Expression um 34 %, 84 %, 99 % und 99 %. SP 600125 verminderte bei Verwendung steigender Konzentrationen von 1  $\mu$ M bis 30  $\mu$ M die LPS-induzierte Bildung der IL-1 $\beta$  mRNA um 41 %, 61 % und 65 %. Die niedrigste Konzentration von 0,1  $\mu$ M hingegen bewirkte keine Veränderung der LPS-induzierten mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ .

### 5.3.4 Einfluss von Makroliden und des Ketolids Telithromycin auf die LPS-induzierte Aktivierung der p38 MAPK und SAPK/JNK

Der Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin bzw. Clarithromycin auf die LPS-induzierte Aktivierung der p38 MAPK und der SAPK/JNK wurde in J-774A.1 Makrophagen untersucht. Die Vorbehandlung der Zellen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin führte zur verminderten Phosphorylierung beider untersuchten MAP-Kinasen (Abb. 47).



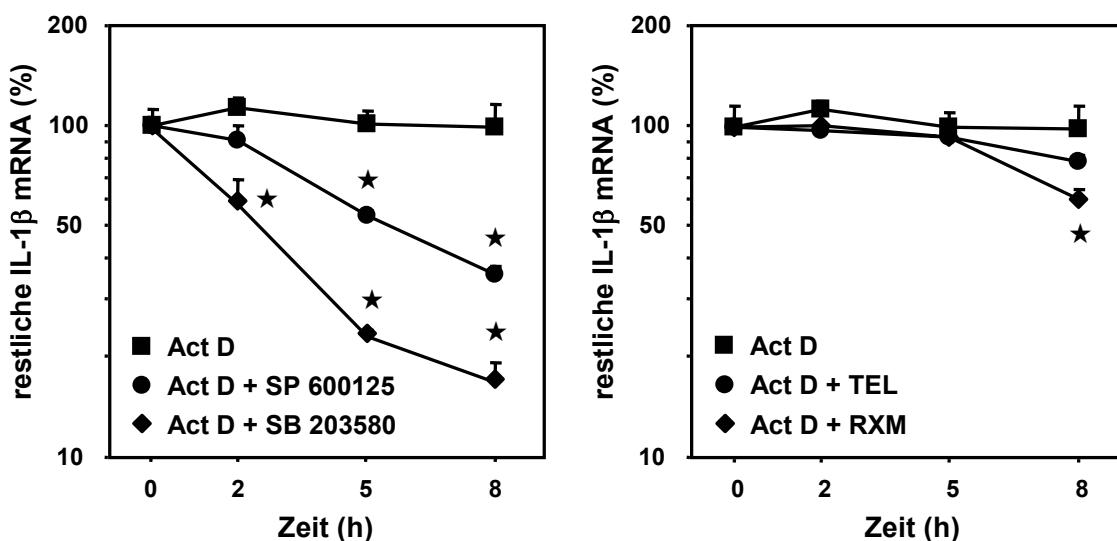
**Abb. 47: Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin auf die LPS-induzierte Phosphorylierung der p38 MAPK und SAPK/JNK in J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden für 1 h mit 80 µg/ml Roxithromycin (RXM), Telithromycin (TEL), Azithromycin (AZM) oder Clarithromycin (CAM) vorinkubiert und danach mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die Anwesenheit der p38 MAPK und SAPK/JNK sowie jeweils deren phosphorylierte Form wurde 3 h nach LPS-Applikation mittels Western Blot bestimmt.

Unter Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin und Azithromycin wurde die LPS-induzierte Bildung der phospho-p38 MAPK deutlich sichtbar gesenkt. Clarithromycin hingegen beeinflusste die Phosphorylierung der p38 MAPK durch LPS nicht. Die Bildung der phospho-SAPK/JNK wurde bei gleichzeitiger Applikation von Roxithromycin, Azithromycin bzw. Clarithromycin sehr stark verringert und bei zusätzlicher Applikation von Telithromycin

fast vollständig gehemmt. Die Vorinkubation der Zellen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin sowie die nachfolgende Stimulation mit LPS hatten keinen Einfluss auf die Anwesenheit der nicht phosphorylierten Formen der p38 MAPK und SAPK/JNK.

### 5.3.5 Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin sowie der MAPK-Inhibitoren SB 203580 und SP 600125 auf Stabilität der IL-1 $\beta$ mRNA

Der Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin sowie der MAPK-Inhibitoren SB 203580 und SP 600125 auf die Stabilität der IL-1 $\beta$  mRNA wurde in J-774A.1 Makrophagen untersucht. Dazu wurde die Halbwertszeit der IL-1 $\beta$  mRNA nach initialer 12-stündiger LPS-Stimulation und anschließender Zugabe des Transkriptionshemmstoffs Actinomycin D bestimmt. Die Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung der p38 MAPK und SAPK/JNK mit SB 203580 bzw. SP 600125, jedoch nicht die Inkubation mit Roxithromycin bzw. Telithromycin, führte zur Destabilisierung der IL-1 $\beta$  mRNA (Abb. 48).



**Abb. 48: Einfluss von SB 203580 und SP 600125 sowie Roxithromycin und Telithromycin auf die Stabilität der IL-1 $\beta$  mRNA nach Stimulation mit LPS in J-774A.1 Makrophagen.** Die Zellen wurden für 12 h mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Danach wurden 30  $\mu$ M SB 203580 bzw. SP 600125 oder 80  $\mu$ g/ml Roxithromycin (RXM) bzw. Telithromycin (TEL) sowie jeweils zur Hemmung der Transkription 2,5  $\mu$ g/ml Actinomycin D (Act D) zugegeben. Die Abundanz der IL-1 $\beta$  mRNA wurde vor (0 h) und 2, 5 und 8 h nach Zugabe von Act D mittels Realtime RT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  Proben pro Gruppe; \*  $p < 0,05$  vs. 0 h

Nach Applikation von Actinomycin D blieb die IL-1 $\beta$  mRNA über den gesamten gemessenen Zeitraum von 8 h stabil; die Halbwertszeit der IL-1 $\beta$  mRNA lag somit über 8 h. Die zusätzliche Applikation von SB 203580 bzw. SP 600125 führte 2 h bzw. 5 h nach Zugabe

von Actinomycin D zur signifikanten Reduktion der verbleibenden Menge an IL-1 $\beta$  mRNA und verringerte damit deren Halbwertszeit auf ca. 2,5 h bzw. 5,5 h. Die Inkubation mit Roxithromycin bzw. Telithromycin hatte 2 h und 5 h nach Applikation von Actinomycin D keinen Einfluss auf die Stabilität der IL-1 $\beta$  mRNA, jedoch wurde 8 h nach Applikation von Actinomycin D die Abundanz der restlichen IL-1 $\beta$  mRNA unter Einfluss von Roxithromycin geringfügig verringert.

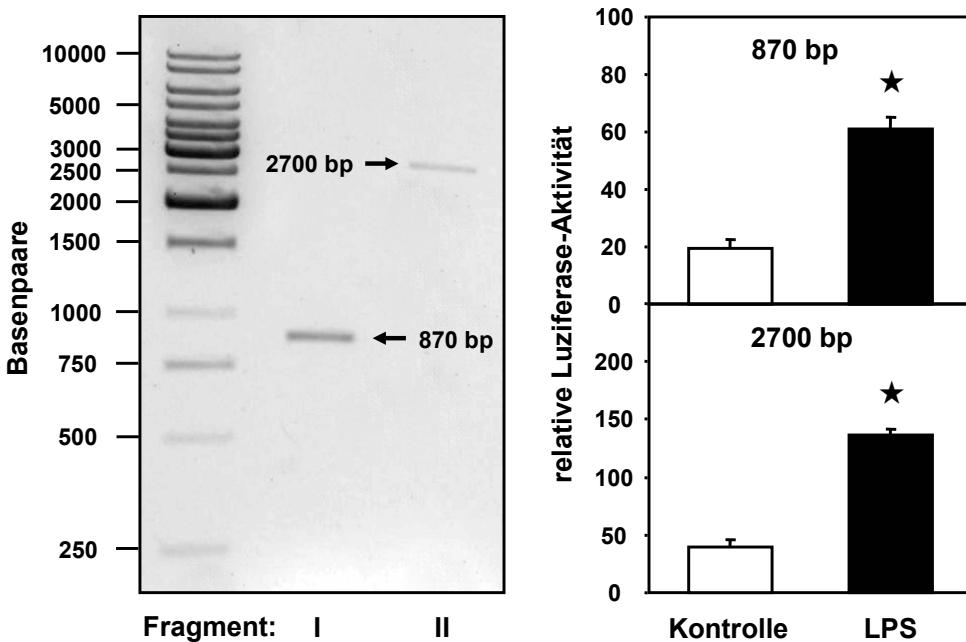
### **5.3.6 Einfluss von Makrolid-Antibiotika und MAPK-Inhibitoren auf die transkriptionelle Regulation des IL-1 $\beta$ -Gens**

#### **5.3.6.1 Herstellung funktionsfähiger IL-1 $\beta$ -Promotorkonstrukte**

Es wurden zwei IL-1 $\beta$ -Promotor-Luziferase Konstrukte generiert, welche ein 870 bp bzw. 2700 bp großes Fragment des murinen IL-1 $\beta$  Promoters – die Fragmente unterschieden sich in der Anzahl der verfügbaren Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren – und das Gen der Luziferase des Leuchtkäfers (Firefly, *Photinus pyralis*) enthielten. Die gewünschten Fragmente des IL-1 $\beta$  Promoters wurden mittels PCR unter Einsatz der spezifischen Primer hergestellt (Abb. 49, links). Beide PCR-Produkte wurden jeweils in einen pGL3-Enhancer-Vektor direkt vor das Gen der Luziferase kloniert, woraufhin die Luziferase in Abhängigkeit von der Aktivität des IL-1 $\beta$  Promotorfragments gebildet wird.

Die Promotorkonstrukte sollten anschließend in J-774A.1 Makrophagen transfiziert werden. Jedoch war es weder mit verschiedenen Transfektionsreagenzien, noch mit Hilfe der Elektroporation oder der Methode der Magnetofektion möglich, diese Zelllinie erfolgreich zu transfizieren. Aus diesem Grund wurden alle nachfolgenden Promotoruntersuchungen mit einer anderen, transfizierbaren Makrophagen-Zelllinie durchgeführt, die freundlicherweise von Dr. Klaus Ruckdeschel (Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, München) zur Verfügung gestellt wurde. Diese Makrophagen werden nachfolgend immer als J-774R bezeichnet

Alle Transfektionen mit J-774R Makrophagen wurden als Co-Transfektionen mit einem der beiden IL-1 $\beta$  Promotorkonstrukte und – zur Kontrolle der Transfektionseffizienz – mit einem Kontrollplasmid, das die Luziferase von *Renilla reniformis* (eine Korallenart) konstitutiv exprimiert, unter Verwendung von ExGen 500 durchgeführt.



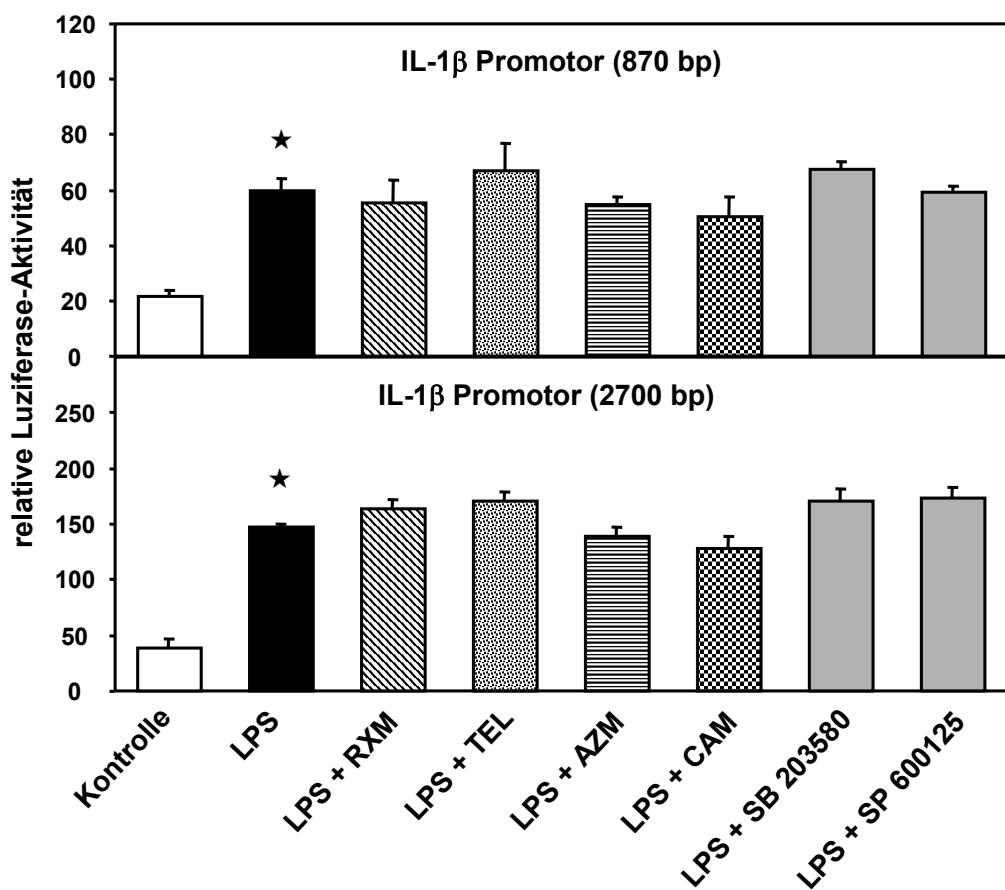
**Abb. 49: PCR-Produkte zur Herstellung der Promotorkonstrukte (links) und Einfluss von LPS auf die Promotoraktivität (rechts)** Links: Nach der PCR wurden die erhaltenen Produkte auf ein 1% Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Rechts: Die mit den Konstrukten transfizierten J-774R Makrophagen wurden mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die Firefly-Luziferaseaktivität wurde 8 h nach LPS-Applikation durch Lumineszenzmessung ermittelt und auf Aktivität der Renilla-Luziferase bezogen. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4$  Proben pro Gruppe;  $\star p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Die Inkubation der mit dem 870 bp IL-1 $\beta$ -Promotorkonstrukt transfizierten J-774R Makrophagen mit LPS führte zu einem signifikanten Anstieg der relativen Luziferase-Aktivität von ca. 20 auf 60 Einheiten und damit zu einer 3-fach gesteigerten Aktivität des 870 bp großen IL-1 $\beta$  Promotorfragments (Abb. 49, rechts oben). Die Stimulation der Zellen mit LPS nach der Transfektion mit dem 2700 bp IL-1 $\beta$ -Promotorkonstrukt führte zu einem signifikanten Anstieg der relativen Luziferase-Aktivität von ca. 40 auf 140 Einheiten und damit zu einer 3,5-fach gesteigerten Aktivität des 2700 bp großen IL-1 $\beta$  Promotorfragments (Abb. 49, rechts unten).

### 5.3.6.2 Beeinflussung der Promotoraktivität von IL-1 $\beta$ durch Makrolide, das Ketolid Telithromycin und die MAPK-Inhibitoren SB 203580 und SP 600125

Nach der Transfektion der J-774R Makrophagen mit dem jeweiligen IL-1 $\beta$ -Promotorkonstrukt wurde der Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin bzw. der MAP-Kinase-Inhibitoren SB 203580 und SP 600125 auf die LPS-induzierte gesteigerte Promotoraktivität untersucht. Weder die verschiedenen Antibiotika,

noch die Inhibitoren der MAP-Kinasen führten zu einer signifikanten Abschwächung der nach LPS-Stimulation gesteigerten Promotoraktivität von IL-1 $\beta$  (Abb. 50).



**Abb. 50: Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin sowie SB 203580 und SP 600125 auf die LPS-induzierte Aktivierung der IL-1 $\beta$  Promotorfragmente in J-774R Makrophagen.** Die mit den Konstrukten transfizierten Makrophagen wurden für 1 h mit 80  $\mu$ g/ml Roxithromycin (RXM), Telithromycin (TEL), Azithromycin (AZM) oder Clarithromycin (CAM) bzw. für 30 min mit 30  $\mu$ M SB 203580 oder SP 600125 vorinkubiert und danach mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Die Firefly-Luziferaseaktivität wurde 8 h nach LPS-Applikation durch Lumineszenzmessung ermittelt und auf Aktivität der Renilla-Luziferase bezogen. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 4 Proben pro Gruppe; \* p < 0,05 vs. Kontrolle.

Die Inkubation der mit den Promotorkonstrukten transfizierten Makrophagen mit LPS führte zwar jeweils zu einer 3 bzw. 3,5-fach gesteigerten relativen Luziferase-Aktivität, jedoch verminderte die Vorbehandlung der Zellen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin bzw. Clarithromycin oder mit SB 203580 bzw. SP 600125 weder die LPS-induzierte Aktivität des 870 bp großen IL-1 $\beta$ -Promotors, noch die Aktivität des großen 2700 bp Promotors signifikant.

# 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirksamkeit des Makrolids Roxithromycin bzw. des Ketolids Telithromycin im akuten Lipopolysaccharid-induzierten Entzündungsgeschehen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche inflammatorische Tiermodelle mit Mäusen verwendet. Zuerst wurden die anti-inflammatorischen Eigenschaften beider Substanzen im Modell einer akuten, lokalen Entzündung der Lunge und danach im Modell einer akuten, systemischen Entzündung des ganzen Körpers bestimmt. Im zweiten Teil der Arbeit sollte der molekulare Mechanismus der anti-inflammatorischen Eigenschaften im Zellkulturmodell mit murinen Makrophagen genauer untersucht werden.

## 6.1 Anti-inflammatorische Wirksamkeit von Roxithromycin und Telithromycin bei akuter Lungenentzündung

Seit Makrolide im Jahr 1982 erfolgreich in die Therapie der diffusen Panbronchiolitis eingeführt wurden (Kudoh *et al.*, 1998), konzentrierten sich viele Studien auf den therapeutischen Einsatz dieser Substanzen bei chronischen entzündlichen Lungenleiden. Es ist jedoch nur wenig über die Effektivität von Makroliden im akuten Entzündungsgeschehen bekannt. Ziel war es daher, die Wirksamkeit des Ketolids Telithromycin mit der des Makrolids Roxithromycin in einem speziellen *in vivo* Modell zu vergleichen, in dem eine akute, lokal auf die Lunge begrenzte Entzündungsreaktion durch Lipopolysaccharid (LPS) ausgelöst wurde.

Eine Lungenentzündung kann durch verschiedene Mikroorganismen, aber auch durch chemische Reizstoffe verursacht werden. Die nasale Applikation von bakteriellem Lipopolysaccharid ist ein geeignetes Modell einer akuten Lungenentzündung, da LPS ein Aktivator des angeborenen Immunsystems und damit ein Trigger der Biosynthese verschiedener Entzündungsmediatoren ist (Guha und Mackman, 2001; Raetz und Whitfield, 2002). Intranasal appliziertes LPS führt innerhalb weniger Stunden zur Bildung und Freisetzung von Zytokinen (Oshikawa *et al.*, 2002). Wichtig scheint dabei die Auswahl des Serotyps, der Dosis und des applizierten Volumens von LPS (Szarka *et al.*, 1997). In

Anlehnung an etablierte Tiermodelle wurde LPS von *E. coli* des Serotyps 055:B5 verwendet, welches als Lösung in einem Volumen von insgesamt 50 µl (25 µl pro Nasenloch) verabreicht wurde (Chignard und Balloy, 2000; Okamoto *et al.*, 2004).

### **6.1.1 Induktion von Entzündungsmediatoren in der Lunge durch nasale Applikation von LPS**

Durch die nasale Verabreichung von LPS wird ein intensives Entzündungsgeschehen induziert, das mit der Bildung proinflammatorischer Mediatoren, der Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen in den Atemwegen einhergeht (Chignard und Balloy, 2000; Oshikawa *et al.*, 2002). Häufig wird die Bestimmung proinflammatorischer Mediatoren oder die Einwanderung von Entzündungszellen in der bronchialen Waschflüssigkeit (BALF, bronchoalveolar lavage fluid) durchgeführt. Man erhält diese durch Kanülieren der Luftröhre und anschließendes Spülen der Lunge mit PBS. Diese Präparation der Lunge ist relativ zeitintensiv. Da neben der Proteinbildung auch die mRNA-Expression verschiedener Mediatoren untersucht werden sollte, war zu befürchten, dass die mRNA während dieser Behandlung am isolierten Organ durch RNasen abgebaut wird. Daher wurde auf die Präparation der BALF verzichtet und die Bestimmung der Entzündungsmediatoren im Gesamthomogenat der Lunge vorgenommen.

Um zu überprüfen, innerhalb welchen Zeitraums die nasale Applikation von LPS zur Induktion proinflammatorischer Mediatoren führt, wurde die LPS-induzierte mRNA- und Proteinexpression über einen Zeitraum von 6 h untersucht. Sowohl die mRNA-Expression als auch die Proteinbildung der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  waren in der Lunge innerhalb von 3 - 6 h nach nasaler Applikation von LPS erhöht (Abb. 9 und Abb. 10). Die Messzeitpunkte für die Bestimmung der mRNA- und Proteinexpression wurden in Anlehnung an die Arbeit von Oshikawa *et al.* (2002) gewählt, die nach nasaler Applikation von LPS für TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 eine maximale Induktion der mRNA- und Proteinexpression nach 3 h fanden. Da Zytokine Induktoren anderer Entzündungsmediatoren sind (Dinarello, 2000), wurde auch die Abundanz der induzierbaren Isoenzyme der Cyclooxygenase (COX-2) und NO-Synthase (NOS-II) bestimmt. Während des gesamten Messzeitraums kam es weder zum Anstieg der COX-2 noch der NOS-II mRNA (Abb. 11). Womöglich bedarf es zur Induktion dieser Enzyme einer längeren Inkubationszeit mit LPS, da andere Arbeitsgruppen eine vermehrte Bildung der NOS-II erst nach 24 h feststellen konnten (Okamoto *et al.*, 2004; Speyer *et al.*, 2003).

## 6.1.2 Makrolid-Antibiotika als anti-inflammatorische Wirkstoffe bei akuter Lungenentzündung

Um die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Roxithromycin und Telithromycin bei akuter Lungenentzündung an Mäusen näher zu charakterisieren, wurde ein spezielles Therapieschema verwendet. In früheren *in vivo* Untersuchungen zur anti-inflammatorischen Wirkung von Makroliden bei Ratten und Mäusen wurden häufig Therapieschemata gewählt, bei denen die Substanzen in einer niedrigen Dosierung über mehrere Tage oder Wochen oral verabreicht wurden (Kaneko *et al.*, 2003; Suzaki *et al.*, 1999; Terao *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu lag das Interesse im Rahmen dieser Dissertation darauf, ob und in welchem Ausmaß Makrolide anti-inflammatorisch wirksam sind, wenn sie als einmalige Einzeldosis intraperitoneal verabreicht werden. Dazu wurden mit einer Dosis von 50 mg/kg für Roxithromycin und 150 mg/kg für Telithromycin Dosierungen verwendet, die zwar deutlich über der für den Menschen gebräuchlichen Dosis liegen, aber zur Anwendung im Tierversuch üblich sind (al-Humayyd, 1997; Kawazu *et al.*, 2000; Tormakangas *et al.*, 2004; Yatsunami *et al.*, 1999). Weder Roxithromycin noch Telithromycin lösten sich in der gewünschten Konzentration in isotoner Kochsalzlösung, so dass jeweils eine Suspension dieser Substanzen intraperitoneal injiziert wurde.

Die Vorbehandlung der Tiere mit einer intraperitoneal verabreichten Einzeldosis von Roxithromycin verminderte die LPS-induzierte Bildung der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in der Lunge sowohl auf Ebene der Genexpression als auch auf Ebene der Proteinexpression (Abb. 12 und Abb. 13). Dies bestätigt die aus dem Modell einer Carragenan-induzierten Brustfellentzündung erhaltenen Ergebnisse, bei dem eine einmalig applizierte orale Einzeldosis von Roxithromycin, Clarithromycin und Erythromycin die Bildung von TNF $\alpha$  im Pleural-Exsudat verringerte (Ianaro *et al.*, 2000). Wie von weiteren Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, führt eine orale Vorbehandlung mit Roxithromycin von 3 bis 4 Wochen nach inhalativer bzw. intratrachealer Applikation von LPS zur Hemmung der Proteinexpression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4 und IL-5 in der Lunge (Konno *et al.*, 1994; Suzaki *et al.*, 1999). In einem Tiermodell, das nach intratrachealer Applikation von *Pseudomonas aeruginosa* den chronischen Verlauf der diffusen Panbronchiolitis simuliert, verminderte eine 10-tägige orale Zufuhr von Clarithromycin die Produktion verschiedener Zytokine, darunter TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und tendenziell auch IFN $\gamma$ , in der Lunge (Yanagihara *et al.*, 2000). Die mRNA-Expression dieser Zytokine wurde jedoch in keiner der genannten Studien bestimmt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass die verminderte

Zytokinproduktion unter Einfluss der Makrolide im akuten Entzündungsgeschehen nicht auf einer Hemmung der Protein-, sondern der Genexpression dieser Zytokine beruht.

Aufgrund früherer Untersuchungen ist bekannt, dass Clarithromycin nicht nur die Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen vermindert, sondern auch die Bildung von Chemokinen bzw. chemotaktischen Faktoren wie IL-8, MIP-1 $\alpha$  und MCP-1 in der BALF von mit *Mycoplasma pneumoniae* infizierten Mäusen (Hardy *et al.*, 2003) oder die Mucusproduktion in einem die diffuse Panbronchiolitis simulierenden, chronischen Entzündungsmodell (Kaneko *et al.*, 2003). Wird die Bildung chemotaktischer Faktoren durch Makrolide gehemmt, führt dies zur reduzierten Einwanderung von Neutrophilen oder Lymphozyten in die Lunge. Für diesen Vorgang ist die Bildung sog. Zelladhäsionsmoleküle und deren Interaktion mit Endothelzellen von entscheidender Bedeutung. Einige Makrolide vermindern nachweislich die Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle in der Lunge von mit Bleomycin behandelten Mäusen bzw. nach intratrachealer Applikation von LPS, was mit einer deutlich reduzierten Anzahl der Neutrophilen in der BALF einherging (Li *et al.*, 2002; Sanz *et al.*, 2005).

Im Verlauf entzündlicher Prozesse spielen auch sekundäre Entzündungsmediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) eine zentrale Rolle. Eine Überproduktion von NO führt zu Zellschäden und einer gesteigerten Gefäßpermeabilität in der Lunge (Gaston *et al.*, 1994). Eine Behandlung mit Erythromycin, Roxithromycin oder Clarithromycin hemmt, wie unter Verwendung verschiedener *in vivo* Entzündungsmodelle gezeigt werden konnte, die Expression der NOS-II und somit die Entstehung von NO in der Lunge (Ianaro *et al.*, 2000; Tamaoki *et al.*, 1999; Terao *et al.*, 2003). Da die Induktion der NOS-II nach nasaler Applikation von LPS innerhalb des untersuchten Zeitraums von 6 h ausblieb, konnten diese Befunde im hier verwendeten Entzündungsmodell nicht überprüft werden (s. Kap. 6.1.1).

Da die diffuse Panbronchiolitis eine relevante Prävalenz in Ostasien, insbesondere in Japan, hat, liegen auch Daten zur anti-inflammatorischen Wirksamkeit von Makroliden bei Menschen vor. In der Bronchialflüssigkeit von Patienten, die über mehrere Wochen mit Makroliden behandelt wurden, ist die Anzahl der Neutrophilen und die Bildung verschiedener Zytokine und Chemokine wie IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8 und IFN $\gamma$  verringert (Ichikawa *et al.*, 1992; Oishi *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2004; Sakito *et al.*, 1996). Zudem nimmt die für die diffuse Panbronchiolitis typische, exzessive Mucusproduktion und -sekretion unter Makrolidtherapie merklich ab (Keicho und Kudoh, 2002; Siddiqui, 2004). Darüber hinaus mehren sich die Berichte, dass mit Makroliden auch gute klinische Erfolge bei der Therapie anderer

entzündlicher Atemwegserkrankungen wie Asthma, chronische Sinusitis oder Mukoviszidose erzielt werden (Amsden, 2005; Gotfried, 2004; Rubin und Henke, 2004).

Vom japanischen Gesundheitsministerium wird zur Therapie der diffusen Panbronchiolitis der Einsatz von Erythromycin oder anderer 14-gliedriger Derivate wie Roxithromycin und Clarithromycin empfohlen. Josamycin, ein 16-gliedriges Makrolide, stellte sich *in vivo* als ineffektiv heraus (Kawashima *et al.*, 2002; Keicho und Kudoh, 2002). Zu den anti-inflammatorischen Eigenschaften des Ketolids Telithromycin wurden bisher keine *in vivo* Studien durchgeführt. Wie Abb. 12 und Abb. 13 zeigen, verminderte die Vorbehandlung der Mäuse mit Telithromycin die LPS-induzierte mRNA- und Proteinexpression der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  in der Lunge. Für Cethromycin, einem weiteren Vertreter der Ketolide, wurde gefunden, dass eine mehrtägige Behandlung mit dieser Substanz die Bildung verschiedener Zytokine und Chemokine, darunter TNF $\alpha$ , IL-8 und IFN $\gamma$ , in der BALF von mit *Mycoplasma pneumoniae* infizierten Mäusen reduziert (Rios *et al.*, 2004). In einer anderen Studie verminderte das Ketolid HMR 3004 die Einwanderung von Neutrophilen und Makrophagen in die Lunge und reduzierte die Freisetzung von IL-6 und NO im Lungengewebe von mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen (Duong *et al.*, 2001). Da bei Ketoliden der Zucker Cladinose an Position C(3) des 14-gliedrigen Macrolactonrings durch eine Ketogruppe ersetzt wurde, scheint dieser Zucker für die anti-inflammatorische Wirkung von Makrolid-Antibiotika nicht entscheidend zu sein. Im Gegensatz dazu ist der Desosamin-Zucker an Position C(5) essentiell für die antibiotische Wirkung von Makroliden und Ketoliden (vgl. Kap. 1.2.2).

Es bleibt somit festzuhalten, dass Ketolide im Tierversuch den konventionellen Makroliden vergleichbare anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen und daher ebenfalls zur Therapie der diffusen Panbronchiolitis oder anderer entzündlicher Lungenerkrankungen in Frage kommen können.

## 6.2 Anti-inflammatorische Wirksamkeit von Roxithromycin und Telithromycin bei akuter systemischer Entzündung

Die meisten Untersuchungen zu den anti-inflammatorischen Eigenschaften von Makroliden wurden im Hinblick auf deren klinische Wirksamkeit bei der Therapie entzündlicher Atemwegserkrankungen durchgeführt. Die Aufmerksamkeit richtete sich daher kaum auf die Effektivität dieser Substanzen in anderen Organen außer der Lunge. Es ist jedoch anzunehmen, dass Makrolide bzw. Ketolide die anti-inflammatorischen Effekte auch systemisch zeigen. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Wirksamkeit des Makrolids Roxithromycin und des Ketolids Telithromycin in einem weiteren *in vivo* Modell untersucht werden, in dem durch intraperitoneale Injektion von Lipopolysaccharid eine akute systemische Entzündungsreaktion ausgelöst wurde.

Die intraperitoneale Applikation von LPS führt innerhalb kurzer Zeit zur gesteigerten Expression von Zytokinen und sekundärer Entzündungsmediatoren wie NO und Prostanoiden (Dinarello, 2000; Raetz und Whitfield, 2002). Das am Institut bestehende Modell der experimentellen Sepsis, bei dem die Tiere eine intravenöse Applikation von 10 mg/kg LPS von *E. coli* des Serotyps 0111:B4 erhalten (Bucher *et al.*, 2001; Höcherl *et al.*, 2002), wurde bezüglich der Dosis und der Applikationsart abgewandelt, um die Versuchstiere nicht übermäßig zu belasten. Mit der intraperitonealen Injektion von 1 mg/kg LPS wurde ein Behandlungsprotokoll gewählt, das eine ausreichende Immunantwort mit Bildung proinflammatorischer Mediatoren gewährleistet (Terao *et al.*, 2003).

### 6.2.1 Induktion von Entzündungsmediatoren durch intraperitoneale Applikation von LPS

Im systemischen Entzündungsgeschehen reagiert der gesamte Körper auf die Anwesenheit von LPS mit der Aktivierung des angeborenen Immunsystems, mit dem Ziel die Invasion des Pathogens zu verhindern (Bochud und Calandra, 2003). Monozyten bzw. Makrophagen produzieren und sezernieren proinflammatorische Zytokine (Calandra *et al.*, 2002), die ihrerseits die Produktion und Freisetzung anderer Mediatoren stimulieren. Dadurch werden verschiedene Zellen des Immunsystems wie neutrophile Granulozyten und Lymphozyten angelockt, die das weitere Entzündungsgeschehen modulieren (Hotchkiss und Karl, 2003).

In Abb. 14 ist die mRNA-Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine nach LPS-Applikation in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz wiedergegeben. In allen Organen ist eine bestimmte zeitliche Reihenfolge der mRNA-Expression der Zytokine zu erkennen, in der TNF $\alpha$  bereits nach 1 h, IL-1 $\beta$  und IL-6 in Abhängigkeit des Organs nach 1 - 2 h und IFN $\gamma$  erst nach 6 h gebildet werden. Diese Reihenfolge wurde auch bei der Proteinbildung dieser Zytokine in Lunge, Leber und im Plasma eingehalten (Abb. 15). Eine ähnliche zeitliche Abfolge für die LPS-induzierte Zytokin-Produktion konnte schon in früheren Untersuchungen in verschiedenen Organen bzw. im Plasma von Ratten und Mäusen festgestellt werden (Salkowski *et al.*, 1997; Sass *et al.*, 2002; Zacharowski *et al.*, 2000). Diesen Zytokinen kommen somit unterschiedliche Funktionen im zeitlichen Verlauf der Entzündungsreaktion zu.

Es ist bekannt, dass proinflammatorische Zytokine, insbesondere TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , Induktoren sekundärer Entzündungsmediatoren wie Prostanoiden und NO sind (Dinarello, 2000). Daher wurde auch die mRNA-Expression der induzierbaren Enzyme COX-2 und NOS-II in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz bestimmt. Die Applikation von LPS bewirkte in Abhängigkeit des jeweiligen Organs bereits nach ca. 2 h eine Induktion der COX-2 und nach ca. 6 h eine deutlich verzögerte Induktion der NOS-II mRNA (Abb. 16). Diese zeitliche Reihenfolge spiegelte sich auch bei der Bildung der Prostanoiden und der Entstehung von NO in Lunge, Leber und im Plasma wieder (Abb. 17). Frühere Untersuchungen bestätigen, dass die Expression der NOS-II mRNA und die nachfolgende Bildung von NO in den einzelnen Organen bzw. im Plasma einer längeren Stimulation mit LPS von mindestens 3 - 6 h bedarf (Lecour *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2005; Salkowski *et al.*, 1997; Terao *et al.*, 2003). Es ist generell akzeptiert, dass die COX-2 zu den sog. „immediate early genes“ (IEG) gehört. Der Zeitpunkt der maximalen Expression der COX-2 und der durch sie gebildeten Prostanoiden nach systemischer LPS-Applikation liegt in Abhängigkeit von der Art der Applikation (i.v. oder i.p.), der verwendeten LPS-Dosis (1 mg/kg bis 10 mg/kg) oder der Art der Versuchstiere (Ratte oder Maus) in einem Zeitraum von ca. 1 - 6 h (Futaki *et al.*, 1997; Höcherl *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 1995).

Im hier verwendeten Modell der LPS-induzierten systemischen Inflammation bei Mäusen wird veranschaulicht, dass zur Induktion der COX-2 bzw. der Prostanoiden aufgrund der zeitlichen Unterschiede in der mRNA-Expression nur die Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, aber nicht IFN $\gamma$  notwendig sind. Im Gegensatz dazu ist IFN $\gamma$ , da dieses Zytokin ebenso wie die NOS-II bzw. NO erst nach mehreren Stunden hinreichend gebildet wird, neben TNF $\alpha$  und

IL-1 $\beta$ , für die Induktion der NOS-II und der nachfolgenden Bildung von NO ganz entscheidend (Salkowski *et al.*, 1997; Thiemermann, 1997).

### 6.2.2 Makrolid-Antibiotika als anti-inflammatorische Wirkstoffe bei akuter systemischer Entzündung

Um die akute anti-inflammatorische Wirksamkeit von Roxithromycin und Telithromycin im akuten systemischen Entzündungsgeschehen zu untersuchen, wurde ebenfalls eine einmalige, intraperitoneal applizierte Einzeldosis der Wirkstoffe verwendet (vgl. Kap. 6.1.2). Die Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin bzw. Telithromycin verminderte die LPS-induzierte mRNA-Expression von IFN $\gamma$  in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz, ebenso wie die mRNA-Expression von TNF $\alpha$  in diesen Organen mit Ausnahme der Milz (Abb. 18 bis Abb. 22). Die LPS-induzierte Bildung der IL-1 $\beta$  mRNA hingegen wurde nur in Lunge, Leber und Niere, die Bildung der IL-6 mRNA nur in Leber und Milz verringert. Diese organspezifischen Unterschiede wurden durch die Messung der Proteinbildung dieser Zytokine in Lunge, Leber und Plasma überprüft. Die LPS-induzierte Bildung der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  wurde unter Einfluss von Roxithromycin bzw. Telithromycin in beiden Organen sowie im Plasma deutlich reduziert, während die Bildung von IL-1 $\beta$  nur in der Lunge und die von IL-6 in keinem der untersuchten Organe verringert wurde (Abb. 23 bis Abb. 25).

Es fällt auf, dass die Produktion von TNF $\alpha$  in der Milz im Gegensatz zu den restlichen Organen von beiden Substanzen unbeeinflusst ist. Möglicherweise liegt das daran, dass die Milz, als eines der sekundären lymphatischen Gewebe, ein Organ der spezifischen Immunantwort ist, die Entstehung der vorliegenden akuten Entzündungssituation aber den Mechanismen der angeborenen Immunität unterliegt. Zum Aufgabenbereich lymphatischer Organe gehört weniger die akute Infektabwehr mit Produktion früher proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , sondern vielmehr die Entwicklung einer spezifischen Abwehrreaktion mit Aktivierung und Mobilisierung von B- und T-Lymphozyten. Es ist allerdings denkbar, dass Makrolide in der Milz dennoch anti-inflammatorische Effekte besitzen, die den fortschreitenden Verlauf einer Entzündung nach Aktivierung der spezifischen Immunsystems beeinflussen. Diese Theorie wird durch die Befunde gestützt, dass Roxithromycin die Expression bestimmter co-stimulierender Signalfaktoren der B-Zellaktivierung wie CD40 in der Milz vermindert, was zur reduzierten Produktion spezifischer IgE-Antikörper führt (Kawazu *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2002).

Da sich die meisten bisherigen Untersuchungen auf die Effektivität der Makrolide im Respirationstrakt konzentrierten, existieren kaum Berichte, die die Wirksamkeit dieser Substanzen im akuten systemischen Entzündungsgeschehen bzw. in anderen Organen außer der Lunge beschreiben. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine einmalige intraperitoneale Einzeldosis von Roxithromycin bzw. Telithromycin auch in anderen Organen wie Leber, Herz und Niere die LPS-induzierte Produktion einiger Zytokine senkt. In einer Studie mit verschiedenen Makroliden wurde nachgewiesen, dass eine Einmalgabe dieser Substanzen die Ödembildung im Modell des Carragenan- bzw. Poly-L-Arginin-induzierten Pfotenödem bei Ratten, dem Standardmodell zur Evaluierung anti-inflammatorischer Wirkstoffe, drastisch reduziert (Agen *et al.*, 1993; Scaglione und Rossoni, 1998). Niedrig-dosierte Erythromycin-Therapie über mehrere Wochen führte bei Zymosan-induzierter Peritonitis zu einer unterdrückten Immunantwort, die mit verringriger Einwanderung von Leukozyten und reduzierter Ödembildung einherging und dabei eine vergleichbare Effektivität mit einer 2-tägigen Dexamethason-Therapie zeigte (Mikasa *et al.*, 1992). Roxithromycin, Azithromycin und Clarithromycin, über einen Zeitraum von 4 Wochen oral verabreicht, führen nach intraperitonealer Applikation von LPS zur reduzierten Bildung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , und IL-6 im Plasma (Terao *et al.*, 2003). Es wurde daher vorgeschlagen, dass Makrolide ihre anti-inflammatorischen Wirkungen erst entfalten, wenn sie über längere Zeit verabreicht werden. Die Befunde von Suzuki *et al.* (1999) zur anti-inflammatorischen Wirksamkeit einer mindestens 7-wöchigen Therapie mit Roxithromycin bei LPS-induzierten Lungenentzündung – eine 5-wöchige Therapie erwies sich als ineffektiv – ließen ebenfalls diese Vermutung zu. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch eine intraperitoneal verabreichte Einzeldosis des Makrolides Roxithromycin sowie auch des Ketolids Telithromycin in der Lage ist, das akute Entzündungsgeschehen zu beeinflussen, indem die LPS-induzierte Bildung bestimmter Zytokine wie TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und teilweise auch IL-1 $\beta$  in verschiedenen Organen gehemmt wurde.

Ein wichtiger Effektormechanismus der angeborenen Immunantwort ist die Mobilisierung von Leukozyten, ein Vorgang, der im Rahmen der Entzündungsreaktion mit Ödembildung und Schwellung einhergeht. Verschiedene Zytokine wie TNF $\alpha$  und insbesondere Chemokine wie IL-8 induzieren eine gerichtete Chemotaxis für Leukozyten, d.h. sie locken Monozyten und Neutrophile aus dem Blut an den Entzündungsherd im Gewebe, indem sie bestimmte Zelladhäsionsmoleküle aktivieren (Suzuki und Ikeda, 2002). Die Ergebnisse verschiedener *in vitro* Untersuchungen belegen, dass Makrolide die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 verringern (Matsuoka *et al.*, 1996; Suzuki und Ikeda, 2002). In

einem Tiermodell einer LPS-induzierter Lungenentzündung konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine mehrtägige Behandlung mit Erythromycin die Expression der Zelladhäsionsmoleküle P- und E-Selektin sowie ICAM-1 und VCAM-1 auch *in vivo* hemmt (Sanz *et al.*, 2005). Dies könnte den Befund erklären, dass die Zahl der Neutrophilen im Exsudat von Mäusen mit Carragenan-induzierter Brustfellentzündung bzw. in der Bronchialflüssigkeit von Patienten mit entzündlichen Atemwegserkrankungen unter Makrolidtherapie stark abnimmt (Ianaro *et al.*, 2000; Ichikawa *et al.*, 1992; Kadota *et al.*, 1993; Sakito *et al.*, 1996). Obwohl, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, Makrolide die Bildung von Zytokinen im akuten Entzündungsgeschehen verringern, konnte im verwendeten Tiermodell keine Beeinflussung der LPS-induzierten mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen durch Roxithromycin oder Telithromycin festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Neben immunmodulatorischen Eigenschaften besitzen Makrolide auch die Fähigkeit, die Beendigung einer Entzündungssituation zu beschleunigen, indem sie den Lebenszyklus von Neutrophilen beeinflussen. Neutrophile sind sehr kurzlebige Zellen mit einer mittleren Verweildauer im Blut von nur ca. 6 - 8 h. Im Knochenmark werden pro Minute etwa 100 Millionen Neutrophile produziert, die schließlich nach wenigen Stunden mittels Apoptose, dem programmierten Zelltod, wieder beseitigt werden. Makrolide sind in der Lage, die Lebenszeit der Neutrophilen zu verkürzen, indem sie den Prozess der Apoptose beschleunigen (Aoshiba *et al.*, 1995; Inamura *et al.*, 2000). Begünstigt wird dies durch die Eigenschaft von Makroliden, sich in Phagozyten wie Neutrophilen und Makrophagen anzureichern (Bosnar *et al.*, 2005; Vazifeh *et al.*, 1997). Da diese Zellen in Entzündungsherden einwandern, werden dort hohe lokale Konzentrationen der Substanzen erreicht (Übersicht bei Schönfeld und Kirst, 2002), was einerseits die Aktivität gegen Bakterien verlängert, andererseits aber auch die Phagozyten-Funktion beeinflusst (Labro, 2000). Womöglich bietet diese spezielle Anreicherung der Makrolide in Entzündungszellen eine Erklärung, warum eine intraperitoneale Einzeldosis von Roxithromycin oder Telithromycin, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die Produktion der Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  in vielen verschiedenen Organen wie Lunge, Leber, Herz, Niere und im Plasma nach intraperitonealer Applikation von LPS wirksam verringern kann. Eine Hauptaufgabe von Phagozyten neben der Zytokinproduktion und -freisetzung ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dieser als oxidativer Burst bezeichnete Vorgang beinhaltet die Aktivierung der NADPH-Oxidase, ein Enzym, das die Entstehung von Sauerstoffradikalen katalysiert (Clark, 1999). Die hauptsächlich von Neutrophilen gebildeten ROS töten infektiöse Mikroorganismen ab, führen aber im Rahmen

entzündlicher Prozesse auch zur Schädigung des betroffenen Gewebes. Verschiedene Studien mit Neutrophilen zeigen, dass Makrolide auch den oxidativen Burst und damit die Produktion schädlicher ROS beeinträchtigen können (Abdelghaffar *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2000). Die Bildung von ROS wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht.

Neben der Aktivierung der NADPH-Oxidase werden im weiteren Verlauf einer Entzündung auch andere inflammatorische Enzyme wie COX-2 und NOS-II induziert, was zur Bildung von Prostanoiden und NO führt (vgl. Kap. 6.2.1). Roxithromycin und Telithromycin reduzierten die LPS-induzierte mRNA-Expression der COX-2 in Leber, Herz und Milz, aber nicht in Lunge und Niere (Abb. 26 bis Abb. 30). Die COX-2 Proteinexpression in Lunge und Leber sowie die Bildung der Prostanoide in Lunge, Leber und Plasma wurde hingegen weder von Roxithromycin noch von Telithromycin beeinflusst (Abb. 31), so dass sich die teilweise erhaltenen Effekte bezüglich der mRNA-Expression nicht bestätigt haben. Wie Abb. 32 und Abb. 33 zeigen, bewirkte jedoch eine Vorbehandlung der Tiere mit Roxithromycin oder Telithromycin eine Verminderung der LPS-induzierten mRNA-Expression der NOS-II in Lunge, Leber, Herz, Niere und Milz sowie eine Reduktion der NOS-II Proteinexpression in Lunge und Leber. Die Entstehung von NO wurde in der Lunge und im Plasma, ansatzweise auch in der Leber, unter Einfluss der Antibiotika ebenfalls verringert (Abb. 34). Da die Bildung des Zytokins IFN $\gamma$ , wie in Kap. 6.2.1 erläutert, entscheidend ist für die Induktion der NOS-II und die nachfolgende Entstehung von NO, ist es denkbar, dass die verringerte Gen- und Proteinexpression der NOS-II eine Folge der gehemmten Zytokinbildung ist. In einer früheren Studie wurde bereits beschrieben, dass eine mehrwöchige orale Therapie mit verschiedenen Makroliden die Expression der NOS-II in der Lunge sowie die Bildung von NO im Plasma nach intraperitonealer LPS-Applikation verringern kann (Terao *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte nun auch gezeigt werden, dass bereits eine intraperitoneale Einzeldosis des Makrolids Roxithromycin bzw. des Ketolids Telithromycin in der Lage ist, die Bildung der induzierbaren NO-Synthase und die nachfolgende Entstehung von NO nach Stimulation mit LPS zu hemmen. Darüber hinaus wurde veranschaulicht, dass diese Makrolid-Antibiotika ihre anti-inflammatorischen Eigenschaften nicht nur in der Lunge, sondern auch in anderen Organen wie Leber, Herz, Niere und Milz ausüben.

Es ist bekannt, dass NO eine entscheidende Rolle bei der Pathophysiologie des septischen Schocks spielt (Hotchkiss und Karl, 2003; Thiemer, 1997). Die durch Endotoxin verursachte Bildung von endogenem NO trägt zu Hypotension und Vasoplegie bei, und ist damit eine der Ursachen des septischen Organversagens. Darüber hinaus führt eine übermäßige Produktion von NO in Wechselwirkung mit Sauerstoffradikalen über Bildung

von Peroxynitrit auch zu direkten Gewebeschäden (Wolkow, 1998). Unerlässlich in der Behandlung der Sepsis ist die antimikrobielle Therapie. Die Auswahl des Antibiotikums erfolgt dabei nach empirischen Gesichtspunkten. Da Makrolide, wie in der vorliegenden Arbeit veranschaulicht, in der Lage sind, unabhängig von ihrer antibiotischen Wirkung die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IFN}\gamma$  und die nachfolgende Entstehung von NO im systemischen Entzündungsgeschehen effektiv zu verringern, könnte diese Antibiotika-Klasse in der Sepsis-Therapie möglicherweise besonders geeignet sein. Dafür sprechen auch die Ergebnisse einer Arbeitsgruppe, die kürzlich gezeigt hat, dass eine intravenöse Applikation von Clarithromycin die systemische Entzündung und damit auch die Mortalität während einer experimentellen Sepsis mit therapie-resistenten *Pseudomonas aeruginosa* bzw. *Escherichia coli* bei Kaninchen drastisch zu senken vermag (Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2004; Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2005).

## 6.3 Anti-inflammatorische Eigenschaften von Makrolid-Antibiotika in murinen Makrophagen

Wie die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen veranschaulicht haben, sind Makrolide und Ketolide in der Lage, die Produktion und/oder Sekretion proinflammatorischer Zytokine zu hemmen. Jedoch kann anhand dieser Studien keine Aussage getroffen werden, welcher molekulare Mechanismus diesen anti-inflammatorischen Eigenschaften zugrunde liegt. Daher wurden im zweiten Teil der Arbeit *in vitro* Experimente mit murinen Makrophagen durchgeführt, die den präzisen molekularen Wirkmechanismus näher charakterisieren sollten.

### 6.3.1 Modell einer akuten LPS-induzierten Entzündungssituation unter Verwendung der murinen Makrophagen-Zelllinie J-774A.1

Zur Etablierung eines geeigneten Zellkulturmodells musste eine Zelllinie gewählt werden, die spezifische Mustererkennungsrezeptoren (PRR) besitzt (vgl. Kap. 1.1.2.3) und nach Kontakt mit Lipopolysaccharid zuverlässig Zytokine produziert. Im Rahmen der angeborenen Immunantwort werden neben neutrophilen Granulozyten insbesondere Makrophagen aktiviert, die eine Verbreitung eines Pathogens durch Phagozytose eindämmen und durch die Produktion und Freisetzung von Zytokinen eine effektive Abwehrreaktion induzieren. Die Makrophagen-Zelllinie J-774A.1 erwies sich als geeignet, da diese Zellen leicht kultivierbar sind und nach Stimulation mit Lipopolysaccharid die Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 produzieren (Martin und Dorf, 1990). Je nach verwendetem LPS-Serotyp empfehlen sich Konzentrationen von 50 ng/ml – 1  $\mu$ g/ml LPS. In Anlehnung an andere Entzündungsmodelle mit Makrophagen oder Monozyten wurde schließlich mit 1  $\mu$ g/ml LPS (von *E. coli*, Serotyp 0111:B4) eine Konzentration verwendet, die eine sichere Induktion der Zytokine in Makrophagen gewährleistet (Ianaro *et al.*, 2000; Suzaki *et al.*, 1999).

### 6.3.2 Induktion von Zytokinen nach Stimulation mit LPS

Der Zusatz von LPS zum Zellkulturmedium löst bei Makrophagen eine unspezifische Immunantwort aus, die mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine einhergeht (Raetz und Whitfield, 2002). Die Inkubation von J-774A.1 Makrophagen mit LPS führte zur gesteigerten mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 (Abb. 35). Es besteht eine bestimmte zeitliche Reihenfolge in der mRNA-Expression dieser Zytokine, bei der zuerst

TNF $\alpha$ , danach IL-1 $\beta$  und zuletzt IL-6 induziert wird. Neben der mRNA-Expression wurde auch die Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$  untersucht. Diese Vorstufe von IL-1 $\beta$  war ca. 8 - 12 h nach Stimulation mit LPS maximal induziert (Abb. 36). Um die Messzeitpunkte zu vereinheitlichen, wurden die nachfolgenden Untersuchungen zur mRNA-Expression für TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zum Zeitpunkt 8 h und für IL-6 zum Zeitpunkt 24 h nach LPS-Applikation durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinexpression von Pro-IL-1 $\beta$  erfolgte zum Zeitpunkt 10 h, die Bestimmung zur Proteinbildung aller Zytokine mittels ELISA zum Zeitpunkt 24 h nach LPS-Applikation.

### 6.3.3 Einfluss der Antibiotika auf die LPS-induzierte Zytokinbildung

Um den Einfluss von Roxithromycin, Azithromycin, Clarithromycin und Telithromycin auf die LPS-induzierte Zytokinbildung untersuchen zu können, musste zuerst eine geeignete Dosierung dieser Substanzen gefunden werden. In der Literatur wird die Verwendung unterschiedlichster Konzentrationen beschrieben, je nachdem, ob die antibiotischen oder die anti-inflammatorischen Eigenschaften dieser Substanzen charakterisiert werden sollten. Im Allgemeinen werden zur Untersuchung der anti-inflammatorischen Wirksamkeit von Makroliden höhere Konzentrationen eingesetzt, die im Bereich von 1 - 100  $\mu$ M (entsprechend ca. 0,8 - 80  $\mu$ g/ml) liegen (Ianaro *et al.*, 2000; Kohri *et al.*, 2000; Morikawa *et al.*, 2002). Die Auswahl der Dosierung richtete sich daher an diese Vorgaben. Da sich Makrolide in Phagozyten anreichern (Übersicht bei Schönfeld und Kirst, 2002), wurde mit einer Vorinkubationszeit von 1 h ein ausreichender Vorlauf vor der LPS-Zugabe gewählt, um die Anreicherung der Wirkstoffe in den Makrophagen zu gewährleisten (Bosnar *et al.*, 2005).

Die Vorbehandlung der Makrophagen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin führte nach Inkubation mit LPS zur reduzierten Bildung der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 auf mRNA- und Proteinebene, verminderte aber weder die mRNA-Expression, noch die Proteinbildung und Freisetzung von TNF $\alpha$  (Abb. 37 bis Abb. 40). Obwohl diese Zelllinie in der Lage ist, große Mengen an IL-1 $\beta$  zu produzieren, wird dieses Zytokin scheinbar nicht von den Makrophagen freigesetzt. Die Tatsache, dass IL-1 $\beta$  nur im Zelllysat, aber nicht im Zellmedium nachweisbar war, deutet darauf hin, dass entweder keine Transportsysteme für IL-1 $\beta$  existieren oder dieses Zytokin intrazellulär gebunden wird. Da der Einfluss der Makrolide auf die LPS-induzierte Bildung von IL-1 $\beta$  am deutlichsten ausgeprägt war, konzentrierten sich die nachfolgenden Experimente auf Bestimmung dieses Zytokins.

Um zu überprüfen, ob die gefundenen Effekte der Makrolid-Antibiotika spezifisch sind, d.h. nicht aufgrund der hohen Konzentration von 80 µg/ml zustande kamen, wurde für alle Wirkstoffe eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung unter Verwendung von Konzentrationen zwischen 0,8 - 80 µg/ml erstellt. Wie Abb. 41 bis Abb. 43 zeigen, hemmten alle Antibiotika die LPS-induzierte mRNA- und Proteinexpression in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration; dieser Effekt war bei Verwendung der höchsten Konzentration am stärksten, gefolgt von der mittleren Konzentration, bei der dieser Effekt zwar geringer aber immer noch deutlich ausfiel, während bei der Verwendung der geringsten Konzentration kaum mehr bzw. nur tendenziell ein Effekt zu verzeichnen war. Makrolide und Ketolide hemmen die IL-1 $\beta$ -Expression demnach spezifisch.

Viele bisherige *in vitro* Studien konzentrierten sich auf die Messung der Zytokine im Zellkulturmedium mittels ELISA. So konnte in Untersuchungen mit Monozyten bzw. Makrophagen bereits nachgewiesen werden, dass Roxithromycin, Azithromycin und Clarithromycin die LPS-induzierte Freisetzung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 ins Zellmedium dosisabhängig verringern (Ianaro *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 1999). Clarithromycin verminderte die LPS-induzierte Produktion von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in einer Studie mit humanen Monozyten, die mit LPS stimuliert wurden, ebenso effektiv wie das Glucocorticoid Dexamethason, welches als Positivkontrolle verwendet wurde (Morikawa *et al.*, 1996). Für Roxithromycin wurde gefunden, dass sogar Dosierungen unter 1 µg/ml ausreichend sind, die LPS-induzierte Bildung von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  deutlich zu reduzieren (Suzaki *et al.*, 1999). Auch das Ketolid Telithromycin ist in der Lage, die Sekretion verschiedener Zytokine, darunter TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, nach Stimulation mit LPS oder Shiga Toxin in Monozyten wirkungsvoll zu hemmen (Araujo *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Makrolide nicht nur die LPS-induzierte Proteinbildung, sondern auch die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  und IL-6 hemmen. Hingegen wurde die TNF $\alpha$ -Produktion nicht beeinflusst. Möglicherweise liegt das daran, dass die Zelllinie J-774A.1 stark auf die Produktion von Interleukinen und weniger auf die Produktion von TNF $\alpha$  spezialisiert ist, so dass insbesondere Effekte auf die Interleukin-Expression deutlich werden. Dies lässt zumindest die starke Induktion der mRNA von IL- $\beta$  (ca. 150-fach) und IL-6 (ca. 200-fach) durch LPS im Gegensatz zu der von TNF $\alpha$  (ca. 5-fach) vermuten.

Aufgrund der hohen Prävalenz der diffusen Panbronchiolitis in Japan, bei deren Pathogenese sich das Chemokin IL-8 als wichtiger chemotaktischer Faktor bezüglich der Rekrutierung von Neutrophilen herausstellte, wurden viele *in vitro* Untersuchungen zur Expression dieses Chemokins in humanen bronchialen Epithelzellen unternommen. Es zeigte sich, dass

Roxithromycin bzw. Erythromycin die mRNA-Expression von IL-8 nach Stimulation mit IL-1 $\alpha$  in diesen Zellen wirkungsvoll reduzieren können, was in der Folge zur verminderten Adhäsion von Neutrophilen an die Epithelzellen führte (Kawasaki *et al.*, 1998; Takizawa *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang wurde auch nachgewiesen, dass Clarithromycin die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 in Fibroblasten verringert (Matsuoka *et al.*, 1996; Miyanohara *et al.*, 2000).

Es ist bekannt, dass Zytokine starke Induktoren sekundärer Entzündungsmediatoren wie Prostanoiden und NO sind (Dinarello, 2000). Die Ergebnisse von Ianaro *et al.* (2000) zeigen, dass Makrolide neben einer verminderten Zytokinproduktion auch die LPS-induzierte Freisetzung von Prostaglandinen und NO verringern. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass die verminderte Freisetzung von Prostaglandinen bzw. NO durch Erythromycin, Clarithromycin bzw. Azithromycin nach der Stimulation mit LPS auf einer Hemmung der mRNA-Expression von COX-2 bzw. NOS-II beruht (Kohri *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2003). Da durch Makrolide nachweislich auch die Produktion verschiedener Zytokine gehemmt wird, ist es wahrscheinlich, dass die von Kohri *et al.* (2002) und Miyazaki *et al.* (2003) gefundene verminderte mRNA-Expression der COX-2 bzw. NOS-II unter Einfluss der Makrolide eine Folge der verminderten Zytokinbildung ist. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, reduzieren Makrolide und Ketolide nicht nur die LPS-induzierte Protein-, sondern auch die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  und IL-6, woraus gefolgt werden kann, dass der Wirkmechanismus der anti-inflammatorischen Eigenschaften der Makrolid-Antibiotika vor oder bei der Transkription der Zytokin-Gene eingreift.

### **6.3.4 Bedeutung der MAP-Kinasen bei der Expression von IL-1 $\beta$ und deren Beeinflussung durch Makrolid-Antibiotika**

Die Antwort des angeborenen Immunsystems auf inflammatorische Stimuli, die zur Aktivierung von Makrophagen führen, erfolgt nach dem Kontakt des Pathogens mit den Mustererkennungsrezeptoren (PRR), indem intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt werden, die das benötigte Signal zur Initiation der Produktion von Entzündungsmediatoren weitergeben. LPS aktiviert diese intrazellulären Kaskaden über die Wechselwirkung mit dem Toll-like Rezeptor-4 (vgl. Kap. 1.1.3.3). Einer dieser intrazellulären Pfade endet mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, ein anderer Weg führt durch Phosphorylierung zur Aktivierung der sog. mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK), die ihrerseits die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren initiieren. Die drei

wichtigsten MAPK in Säugetier-Zellen sind die p44/42 MAPK (bzw. ERK 1/2), die SAPK/JNK und die p38 MAPK (vgl. Kap. 1.1.3.4).

Um zu überprüfen, ob und innerhalb welchen Zeitraums diese MAP-Kinasen in der Makrophagen-Zelllinie J-774A.1 nach Stimulation mit LPS aktiviert werden, wurde der Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen über die Zeit bestimmt. Wie Abb. 44 zeigt, führte die Inkubation mit LPS nach ca. 2 - 4 h zur Aktivierung aller drei MAP-Kinasen. Es ist bekannt, dass die verschiedenen MAP-Kinase-Wege an der Regulation unterschiedlicher inflammatorischer Mediatoren beteiligt sind (Chang und Karin, 2001). Daher wurde die Beteiligung der drei MAP-Kinasen bei der Expression der IL-1 $\beta$  mRNA in J-774A.1 Makrophagen untersucht. Dazu wurde die Enzymaktivität der einzelnen Kinasen durch Zusatz selektiver Inhibitoren (SB 203580 für p38 MAPK, SP 600125 für SAPK/JNK, PD 98059 für p44/42 MAPK) gehemmt und die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit LPS bestimmt. Üblicherweise werden Konzentrationen von 10 - 50  $\mu$ M des jeweiligen Inhibitors verwendet (Caivano und Cohen, 2000; Jeon *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2004). Die Inhibitoren SB 203580 und SP 600125, jedoch nicht der Inhibitor PD 98059 verringerten bei Verwendung einer Konzentration von jeweils 30  $\mu$ M deutlich die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  (Abb. 45). Es handelt sich dabei um einen spezifischen Effekt dieser beiden Inhibitoren, wie die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen in Abb. 46 zeigen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Aktivierung beider Signaltransduktionswege, sowohl der Weg der p38 MAPK als auch der der SAPK/JNK, bedeutsam für die Induktion von IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit LPS ist. Hingegen scheint die p44/42 MAPK bei der Expression dieses Zytokins in dieser Zelllinie keine Rolle zu spielen. Die Beteiligung der p38 MAPK an der LPS-induzierten IL-1 $\beta$  mRNA-Expression in Makrophagen ist bereits beschrieben worden (Baldassare *et al.*, 1999; Caivano und Cohen, 2000; Kim *et al.*, 2004). Die p38 MAPK reguliert darüber hinaus auch die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-12 oder die Produktion von NO in murinen Makrophagen (Beyaert *et al.*, 1996; Brook *et al.*, 2000; Chen und Wang, 1999; Kim *et al.*, 2004). Die SAPK/JNK ist ebenfalls an der Regulation proinflammatorischer Zytokine oder der Produktion von NO beteiligt (Chan und Riches, 1998; Dong *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2004). Darüber hinaus scheint sie auch eine Bedeutung bei der Aktivierung der T-Zellaktivierung zu haben (Dong *et al.*, 2001; Su *et al.*, 1994).

Da die p38 MAPK und die SAPK/JNK infolge einer Stimulation mit LPS aktiviert werden und diese Aktivierung, wie gezeigt, entscheidend für die LPS-induzierte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  in J-774A.1 Makrophagen ist, könnte eine Hemmung dieser Proteinkinasen

möglicherweise die Ursache für die anti-inflammatorischen Effekte der Makrolid-Antibiotika sein. Dies wurde überprüft, indem der Einfluss von Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin auf den Phosphorylierungsstatus beider MAP-Kinasen nach Stimulation mit LPS untersucht wurde. Wie in Abb. 47 gezeigt wird, hemmten Roxithromycin, Telithromycin und Azithromycin die Phosphorylierung der p38 MAPK und der SAPK/JNK nach LPS-Stimulation, während Clarithromycin nur die Phosphorylierung der SAPK/JNK, aber nicht die der p38 MAPK verminderte. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde bereits gefunden, dass Erythromycin bzw. Roxithromycin die Expression von Entzündungsmediatoren wie Chemokinen oder der COX-2 nach einer Stimulation mit verschiedenen Zytokinen durch Hemmung der Aktivierung der p38 MAPK in rheumatoiden Synovialzellen bzw. Keratinozyten vermindern (Fumimori *et al.*, 2004; Komine *et al.*, 2005). Andere Untersuchungen hingegen konzentrierten sich auf die Beeinflussung der ERK 1/2 durch Makrolide, wobei festgestellt wurde, dass Azithromycin in der Lage ist, die Aktivierung der ERK 1/2 zu unterdrücken, woraus eine geringere Neutrophilen-Chemotaxis bzw. eine verminderte Mucusproduktion durch Epithelzellen resultierte (Imamura *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2004). In einem *in vivo* Modell, das die Entzündungssituation der diffusen Panbronchiolitis simuliert, wurde ebenfalls gefunden, dass eine Behandlung mit Clarithromycin die Aktivierung der ERK 1/2 im Lungenhomogenat hemmt, was in der Folge zur verminderten Mucusproduktion führte (Kaneko *et al.*, 2003).

Der Einfluss von Makroliden auf die Aktivierung der SAPK/JNK infolge inflammatorischer Stimuli wurde bisher kaum untersucht. Zudem gibt es keine Studien, die den Einfluss von Ketoliden auf die Aktivierung der MAP-Kinasen beschreiben. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Makrolide ebenso wie Ketolide neben der Aktivierung der p38 MAPK auch die Aktivierung der SAPK/JNK nach einer Stimulation mit LPS in J-774A.1 Makrophagen vermindern. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Makrolide und Ketolide die verminderte LPS-Induktion der IL-1 $\beta$  mRNA-Expression durch Hemmung der Aktivierung sowohl der p38 MAPK als auch der SAPK/JNK bewirken.

### 6.3.5 Einfluss der Antibiotika auf die mRNA-Stabilität von IL-1 $\beta$

Die Konzentration der für die Translation zur Verfügung stehenden mRNA ist abhängig von dem Ausmaß der RNA-Synthese im Zellkern, der anschließenden Reifung und dem Transport der RNA sowie der Degeneration der mRNA im Zytoplasma (Kracht und Saklatvala, 2002). Der Abbau der mRNA spielt daher eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression. In tierischen Zellen modulieren viele physiologische Signale das Maß des mRNA-Abbaus

(Bevilacqua *et al.*, 2003). Je nach Gen oder Zellart kann die Stabilität der mRNA stark variieren.

Um die Stabilität der IL-1 $\beta$  mRNA in J-774A.1 Makrophagen zu untersuchen, wurde die zelluläre Transkription nach einer initialen Stimulation mit LPS durch den Transkriptionshemmstoff Actinomycin D gehemmt und die Abundanz der verbleibenden mRNA in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Wie Abb. 48 zeigt, änderte sich die Menge der nach der Inkubation mit LPS gebildeten IL-1 $\beta$  mRNA über den gesamten Zeitraum nicht. Die Halbwertszeit der IL-1 $\beta$  mRNA liegt damit über 8 h. Die gleichzeitige Inkubation mit den MAPK-Inhibitoren SB 203580 und SP 600125 führte hingegen zur starken Abnahme der mRNA-Stabilität, sodass die Halbwertzeit der IL-1 $\beta$  mRNA auf ca. 2,5 bis 5,5 h verkürzt wurde. Dies bedeutet, dass für die Stabilisierung der IL-1 $\beta$  mRNA in diesen Makrophagen die Aktivierung der p38 MAPK und der SAPK/JNK von Bedeutung ist. Es konnte schon früher gezeigt werden, dass die p38 MAPK bzw. die SAPK/JNK die Expression von Zytokinen oder anderer Entzündungsmediatoren über die Stabilisierung der mRNA kontrollieren (Dean *et al.*, 1999; Lahti *et al.*, 2003; Winzen *et al.*, 1999). MAP-Kinasen besitzen somit bei der Regulation der Genexpression eine Doppelrolle, da sie einerseits die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren steuern und andererseits eine Stabilisierung der transkribierten mRNA bewirken.

Da Makrolid-Antibiotika, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die Aktivierung der p38 MAPK und der SAPK/JNK vermindern, wurde auch der Einfluss von Roxithromycin und Telithromycin auf die Stabilität der IL-1 $\beta$  mRNA untersucht. Keine der beiden Substanzen führte zum deutlich beschleunigten Abbau der LPS-induzierten IL-1 $\beta$  mRNA (Abb. 48). Möglicherweise tritt diese Wirkung jedoch erst nach mehreren Stunden ein, worauf der leichte Abfall der mRNA bei Roxithromycin nach 8 h hinweisen könnte. Jedoch war es aufgrund der zytotoxischen Wirkung von Actinomycin D nicht möglich, die mRNA-Degradation über einen längeren Zeitraum zu verfolgen.

### **6.3.6 Einfluss von Makroliden und Ketoliden auf die transkriptionelle Regulation des IL-1 $\beta$ Gens**

Die Aktivierung der p38 MAPK und der SAPK/JNK führt auch zur Aktivierung und Mobilisierung von Transkriptionsfaktoren, welche nach Translokation in den Zellkern die Transkription inflammatorischer Gene regulieren (Su und Karin, 1996). Die Transkription wird initiiert, indem diese Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen des

Promotors, der regulatorischen Einheit des zu transkribierenden Gens, binden und damit den Startpunkt für die RNA-Polymerase, welche die Synthese der mRNA katalysiert, markieren (Übersicht bei Knippers, 2001). Die transkriptionelle Regulation der Genexpression von IL-1 $\beta$  unterliegt verschiedenen Transkriptionsfaktoren, insbesondere AP-1 (Hurme und Matikainen, 1993; Serkkola und Hurme, 1993), aber auch NF $\kappa$ B, CREB und NF-IL6 (Cogswell *et al.*, 1994; Godambe *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 1993).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei partielle Promotorkonstrukte des IL-1 $\beta$  Gens generiert, die eine verschiedene Anzahl an Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren tragen. Das 870 bp große Fragment, das nach den Vorgaben von Kang *et al.* (2004) hergestellt wurde, enthält die stromaufwärts liegende Promotorregion von -1809 bis -2679 des murinen IL-1 $\beta$  Gens, die Bindungsstellen für AP-1, CREB und NF-IL6, jedoch nicht für NF $\kappa$ B beinhaltet. Das 2700 bp große Fragment umfasst den stromaufwärts liegenden Bereich des Promotors von +19 bis -2679 des murinen IL-1 $\beta$  Gens, und enthält neben den Bindungsstellen des 870 bp-Konstrukts zusätzliche Bindungsstellen, wie z.B. für NF $\kappa$ B (Lebedeva und Singh, 1997). Diese Promotorfragmente wurden in einen pGL3-Enhancer-Vektor vor das Gen der Luziferase kloniert, woraufhin dieses Enzym in Abhängigkeit von der Aktivität des Promotorfragments gebildet wird. Dazu sollten die fertiggestellten Konstrukte in die Makrophagenzelllinie J-774A.1 transfiziert und anschließend durch Stimulation mit LPS auf deren Funktionstüchtigkeit getestet werden. Es stellte sich heraus, dass es mit keiner der in Kap. 4.3.3 beschriebenen Methoden möglich war, diese Zelllinie erfolgreich zu transfizieren. Dies wurde kürzlich auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, die bei der Transfektion von Plasmid-DNA in J-774A.1 Makrophagen ebenfalls scheiterten (Arkusz *et al.*, 2006; Van De Parre *et al.*, 2005).

Alle Transfektionen wurden daher mit einer anderen Makrophagen-Zelllinie durchgeführt, die problemlos zu transfizieren ist (Ruckdeschel *et al.*, 2001). Diese als J-774R bezeichneten Makrophagen produzieren ebenfalls IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit LPS, jedoch hemmten die Makrolid-Antibiotika die Expression der IL-1 $\beta$  mRNA in diesen Makrophagen nicht so stark wie in der Zelllinie J-774A.1 (Daten nicht gezeigt). Nach der Transfektion der pGL3-IL-1 $\beta$ -Promotorkonstrukte in J-774R Makrophagen stieg die Luziferase-Aktivität bei beiden Konstrukten unter Behandlung mit LPS um das 3- bis 4-Fache an (Abb. 49). Dies belegt zum einen, dass beide Konstrukte erfolgreich in diese Makrophagen transfiziert wurden, und zum anderen, dass beide Promotorfragmente funktionstüchtig sind, d.h. unter Einfluss von LPS aktiviert werden und die Transkription des Luziferase-Gens einleiten.

Wie Abb. 50 zeigt, hatte eine zusätzliche Inkubation der transfizierten Zellen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin oder Clarithromycin sowohl bei Verwendung des 870 bp Konstrukts als auch bei Verwendung des 2700 bp Konstrukts keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Luziferase-Aktivität. Aus diesem Ergebnis kann der Schluss gezogen werden, dass Makrolid-Antibiotika die Hemmung der LPS-induzierten IL-1 $\beta$  mRNA-Expression nicht durch eine Beeinflussung der Transkription des IL-1 $\beta$  Gens bewirken. Da, wie gezeigt, Makrolid-Antibiotika die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und SAPK/JNK vermindern, wurde auch der Einfluss der MAPK-Inhibitoren SB 203580 und SP 600125 auf die LPS-induzierte Luziferase-Aktivität untersucht. Beide Inhibitoren zeigten keinerlei Einfluss auf die LPS-induzierte Luziferase-Aktivität, weder bei Verwendung des 870 bp Konstrukts noch bei Verwendung des 2700 bp Konstrukts (Abb. 50). Dies bedeutet, dass die Aktivierung der p38 MAPK und der SAPK/JNK sowie die nachfolgende Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 zur Initiation der Transkription des IL-1 $\beta$  Gens nicht von Bedeutung sind. Damit steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu den Berichten anderer Autoren, die die Bedeutung der Aktivierung der MAP-Kinasen und des Transkriptionsfaktors AP-1 bei der Genexpression von IL- $\beta$  belegt haben (Caivano und Cohen, 2000; Dinarello, 1996; Kang *et al.*, 2004; Serkkola und Hurme, 1993).

Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass Erythromycin bzw. Clarithromycin die Genexpression von IL-8 über eine Hemmung der Aktivierung von AP-1 in humanen bronchialen Epithelzellen bzw. Monozyten unterdrücken (Abe *et al.*, 2000; Desaki *et al.*, 2000; Kikuchi *et al.*, 2002). Untersuchungen mit nasalen Fibroblasten ergaben, dass Roxithromycin die Bildung von Matrixmetalloproteininasen – Enzyme, die an der Regulation verschiedener biologischer Prozesse im Rahmen des Entzündungsgeschehens beteiligt sind – über eine Hemmung der Aktivierung von AP-1 reduziert (Kanai *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass die Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 unter inflammatorischen Bedingungen meist über die SAPK/JNK und p38 MAPK vermittelt wird (Chang und Karin, 2001). Die Hemmung der Aktivität dieser MAP-Kinasen sollte daher über die verringerte Aktivierung von AP-1 zur verminderten Genexpression von IL-1 $\beta$  führen.

Die Stimulation von Makrophagen mit LPS aktiviert jedoch nicht nur die MAP-Kinase-Wege, sondern auch den NF $\kappa$ B-Signalweg, welcher mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B endet (Guha und Mackman, 2001). Es wurde berichtet, dass dieser Transkriptionsfaktor ebenfalls ein Target der Makrolid-Antibiotika ist, da Erythromycin und Clarithromycin neben der Aktivierung von AP-1 auch die Aktivierung von NF $\kappa$ B verringerten (Desaki *et al.*, 2000; Ichiyama *et al.*, 2001; Kanai *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2002). Die direkte

Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB durch Makrolid-Antibiotika in J-774A.1 Makrophagen wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.

Es ist dennoch anzunehmen, dass Makrolid-Antibiotika auch in diesen Makrophagen die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren hemmen, was sich schließlich in einer verminderten Promotoraktivität äußern sollte. Die widersprüchlichen Ergebnisse der Reportergen-Assays sollten daher kritisch bewertet werden. Möglicherweise sind diese Ergebnisse auf Schwachstellen bei der Etablierung des Systems zurückzuführen. Beide Promotorkonstrukte sprechen zwar auf die Stimulation mit LPS an, jedoch ist die Aktivitätssteigerung des Promoters unerwartet gering. In Anbetracht der Tatsache, dass die IL-1 $\beta$  mRNA-Expression nach Stimulation mit LPS um den Faktor 100 - 150 anstieg, erscheint eine gesteigerte Promotoraktivität um den Faktor 3 - 4 ziemlich gering. Zudem war auffallend, dass die basale IL-1 $\beta$  Promotoraktivität der unbehandelten Kontrollen relativ hoch lag, im Gegensatz dazu aber die IL-1 $\beta$  mRNA basal kaum exprimiert wurde. Diese hohen Basalwerte bzw. die schwache Induktion der Luziferase-Aktivität könnten aufgrund der Transfektions-Prozedur entstanden sein, die für diese Zellen eine große Stresssituation darstellte, woraufhin die Makrophagen mit der Bildung von Stressmediatoren, darunter Zytokine, reagierten. Es ist daher möglich, dass die Transfektion selbst den Promotor bereits aktiviert haben könnte, so dass dieser in der Folge durch LPS kaum mehr stimuliert werden konnte. Dies würde erklären, warum nicht nur die Inkubation mit Makrolid-Antibiotika sondern auch die Inkubation mit MAPK-Inhibitoren wirkungslos war. Es ist jedoch auch zu beachten, dass die Reportergen-Assays in J-774R durchgeführt wurden und nicht in J-774A.1 Makrophagen, die auf die Produktion von IL-1 $\beta$  spezialisiert sind. Ein weiterer Schwachpunkt ist das zur Kontrolle der Transfektionseffizienz eingesetzte Kontrollplasmid. Dieses soll die Luziferase von *Renilla reniformis* konstitutiv und unabhängig von äußeren Einflüssen exprimieren. Jedoch wurde durch die Stimulation mit LPS neben der Aktivität der Firefly-Luziferase auch die Aktivität der Renilla-Luziferase um etwa das 3-Fache gesteigert, was sich in einer geringeren relativen Luziferase-Aktivität bemerkbar machte. Auch die Verwendung anderer Kontrollplasmide eignete sich nur bedingt als interner Standard.

Viele Autoren verwenden zur Untersuchung der Genexpression von Zytokinen oder anderer inflammatorischer Mediatoren die murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7, die für Transfektionen und Reportergen-Assays besonders gut geeignet zu sein scheint (Hirotani *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004; Lebedeva und Singh, 1997). Es wäre daher sinnvoll, die *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss von Makroliden und Ketoliden auf die Expression von Zytokinen in dieser Zelllinie zu wiederholen.

# 7 Zusammenfassung

## 7.1 Hintergrund und Fragestellungen

Makrolid-Antibiotika sind aufgrund ihres breiten Wirkspektrums eine wichtige Wirkstoffklasse zur Behandlung von Atemwegsinfektionen. Die neueste Entwicklung dieser Antibiotika-Klasse stellt die Gruppe der Ketolide dar, bei denen der Zucker Cladinose am makrozyklischen Lactonring durch eine Ketogruppe ersetzt wurde, wodurch ein erweitertes Wirkspektrum und eine geringere Resistenzentwicklung erzielt wurde. Interessanterweise werden Makrolide in Ostasien auch erfolgreich zur Therapie der diffusen Panbronchiolitis, einer chronischen entzündlichen Atemwegserkrankung, eingesetzt. Es ist bekannt, dass diese günstigen therapeutischen Effekte der Makrolide nicht auf deren antibiotische, sondern vielmehr auf anti-inflammatoryische und immunmodulatorische Eigenschaften zurückzuführen sind. Die anti-inflammatoryischen Eigenschaften von Makroliden wie z.B. Roxithromycin und Clarithromycin wurden vornehmlich im chronischen Entzündungsgeschehen und im Hinblick auf deren Wirksamkeit in der Lunge nachgewiesen, wobei sich eine niedrig-dosierte Makrolid-Therapie über mehrere Wochen und Monate bewährt hat.

Über die anti-inflammatoryische Wirksamkeit des Ketolids Telithromycin ist wenig bekannt. Ebenso gibt es kaum Daten, die die Effektivität einer Akut-Behandlung mit Makroliden bzw. Ketoliden im akuten Entzündungsgeschehen nicht nur in der Lunge, sondern auch in anderen Organen beschreiben. Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher geklärt werden, ob Telithromycin ebenfalls therapeutisch relevante anti-inflammatoryische Eigenschaften besitzt, und ob Makrolide bzw. Ketolide bereits anti-inflammatoryisch wirksam sind, wenn sie als einmalige Einzeldosis verabreicht werden. Darüber hinaus sollte der molekulare Mechanismus dieser anti-inflammatoryischen Effekte im Zellkulturmodell mit murinen Makrophagen genauer untersucht werden.

## 7.2 Ergebnisse und Diskussion

Zur Untersuchung der anti-inflammatoryischen Eigenschaften von Makroliden wurden unterschiedliche inflammatorische Tiermodelle mit Mäusen verwendet, bei denen eine akute

lokale bzw. systemische Entzündungssituation durch nasale bzw. intraperitoneale Applikation von Lipopolysaccharid (LPS) verursacht wurde. Die nasale Verabreichung von LPS führte in der Lunge zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems, wodurch die proinflammatorischen Zytokine  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  und  $\text{IFN}\gamma$  innerhalb weniger Stunden gebildet und freigesetzt wurden. Die zusätzliche Applikation einer hohen intraperitonealen Einzeldosis von Roxithromycin oder Telithromycin senkte die LPS-induzierte Bildung und Freisetzung dieser Zytokine deutlich.

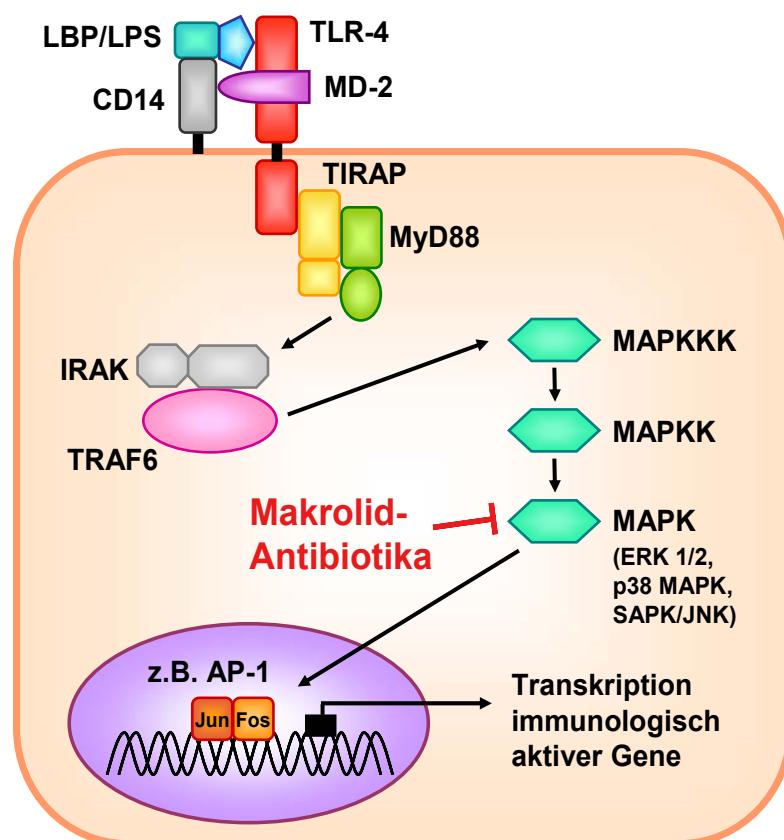
Da sich Makrolid-Antibiotika hervorragend in Phagozyten anreichern, ist anzunehmen, dass diese Substanzen auch in anderen Organen als der Lunge anti-inflammatoryisch wirksam sind. Daher wurde durch intraperitoneale Applikation von LPS eine systemische Entzündungsreaktion des ganzen Körpers ausgelöst, was sich in der Bildung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und sekundärer Entzündungsmediatoren wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) in verschiedenen Organen äußerte. Die zusätzliche Applikation einer hohen intraperitonealen Einzeldosis von Roxithromycin oder Telithromycin verringerte in Lunge, Leber, Herz und Niere die LPS-induzierte Bildung der Zytokine  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  und teilweise auch  $\text{IL-1}\beta$ , was nachfolgend auch zur verminderten Expression der induzierbaren NO-Synthase und Entstehung von NO führte. Diese Ergebnisse zeigen, dass bereits eine Einzeldosis von Roxithromycin und Telithromycin in der Lage ist, in das akute Entzündungsgeschehen einzutreten, indem die Gen- und Proteinexpression verschiedener Entzündungsmediatoren, insbesondere proinflammatorischer Zytokine, verringert wurde. Diese Eigenschaft der Makrolid-Antibiotika ist zudem nicht nur auf die Lunge beschränkt. Das Ketolid Telithromycin erwies sich als ebenso wirksam wie das Makrolid Roxithromycin. Da bei Ketoliden der Zucker Cladinose durch eine Ketogruppe ersetzt wurde, scheint diese Struktur nicht für die anti-inflammatoryischen Eigenschaften der Makrolid-Antibiotika verantwortlich zu sein.

Um den präzisen molekularen Mechanismus dieser anti-inflammatoryischen Eigenschaften näher charakterisieren zu können, wurden zusätzlich *in vitro* Untersuchungen an murinen Makrophagen durchgeführt, die nach Stimulation mit LPS insbesondere das Zytokin  $\text{IL-1}\beta$  bilden. In Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration verringerten Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin die LPS-induzierte Gen- und Proteinexpression dieses Zytokins. Es ist bekannt, dass zur Expression inflammatoryer Gene wie  $\text{IL-1}\beta$  die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) eine wichtige Rolle spielt. Die gleichzeitige Inkubation von Makrophagen mit Roxithromycin, Telithromycin, Azithromycin und Clarithromycin reduzierte sowohl die LPS-induzierte

Aktivierung der p38 MAPK als auch die der SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Makrolide bzw. Ketolide die verminderte Genexpression von IL-1 $\beta$  – zuminderst teilweise – über eine Hemmung der Aktivierung dieser beiden MAP-Kinasen bewirken.

### 7.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine akute Behandlung mit Makroliden bzw. Ketoliden im *in vivo* Modell der akuten LPS-induzierten Entzündung die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und teilweise auch IL-1 $\beta$  sowie die Bildung von NO vermindern kann. Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen weisen darauf hin, dass Makrolide und Ketolide die Regulation der Genexpression inflammatorischer Gene über eine Hemmung der Aktivierung von MAP-Kinasen beeinflussen (Abb. 51).



**Abb. 51: Mögliche Regulation der LPS-induzierten Expression inflammatorischer Gene durch Makrolid-Antibiotika.** Die Bindung von LPS an den Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) führt zur Assoziation der Adaptormoleküle TIRAP, MyD88, IRAK und TRAF6. Durch TRAF6 werden die MAP-Kinasen ERK 1/2, p38 MAPK und SAPK/JNK aktiviert, die ihrerseits verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 phosphorylieren, welche im Zellkern die Transkription immunologisch aktiver Gene einleiten. Makrolid-Antibiotika hemmen die Aktivierung einzelner MAP-Kinasen, woraufhin die nachfolgende Transkription inflammatorischer Gene beeinflusst wird.

## 8 Literaturverzeichnis

Abdelghaffar, H., Vazifeh, D. und Labro, M.T. (2001) Cellular uptake of two fluoroketolides, HMR 3562 and HMR 3787, by human polymorphonuclear neutrophils in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2798-2806.

Abdelghaffar, H., Babin-Chevaye, C. und Labro, M.T. (2005) The macrolide roxithromycin impairs NADPH oxidase activation and alters translocation of its cytosolic components to the neutrophil membrane in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2986-2989.

Abe, S., Nakamura, H., Inoue, S., Takeda, H., Saito, H., Kato, S., Mukaida, N., Matsushima, K. und Tomoike, H. (2000) Interleukin-8 gene repression by clarithromycin is mediated by the activator protein-1 binding site in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**: 51-60.

Aderem, A. und Ulevitch, R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**: 782-787.

Agen, C., Danesi, R., Blandizzi, C., Costa, M., Stacchini, B., Favini, P. und Del Tacca, M. (1993) Macrolide antibiotics as antiinflammatory agents: roxithromycin in an unexpected role. *Agents Actions* **38**: 85-90.

Aggarwal, B.B. und Natarajan, K. (1996) Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* **7**: 93-124.

Agouridas, C., Denis, A., Auger, J.M., Benedetti, Y., Bonnefoy, A., Bretin, F., Chantot, J.F., Dussarat, A., Fromentin, C., D'Ambrieres, S.G., Lachaud, S., Laurin, P., Le Martret, O., Loyau, V. und Tessot, N. (1998) Synthesis and antibacterial activity of ketolides (6-O-methyl-3-oxoerythromycin derivatives): a new class of antibacterials highly potent against macrolide-resistant and -susceptible respiratory pathogens. *J Med Chem* **41**: 4080-4100.

Akira, M., Kitatani, F., Lee, Y.S., Kita, N., Yamamoto, S., Higashihara, T., Morimoto, S., Ikezoe, J. und Kozuka, T. (1988) Diffuse panbronchiolitis: evaluation with high-resolution CT. *Radiology* **168**: 433-438.

Akira, S. (2003) Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* **278**: 38105-38108.

al-Humayyd, M.S. (1997) Pharmacokinetic interactions between erythromycin, clarithromycin, roxithromycin and phenytoin in the rat. *Chemotherapy* **43**: 77-85.

Alvarez-Elcoro, S. und Enzler, M.J. (1999) The macrolides: erythromycin, clarithromycin, and azithromycin. *Mayo Clin Proc* **74**: 613-634.

Amsden, G.W. (1995) Macrolides versus azalides: a drug interaction update. *Ann Pharmacother* **29**: 906-917.

Amsden, G.W. (2005) Anti-inflammatory effects of macrolides--an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? *J Antimicrob Chemother* **55**: 10-21.

Aoshiba, K., Nagai, A. und Konno, K. (1995) Erythromycin shortens neutrophil survival by accelerating apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 872-877.

Araujo, F.G., Slifer, T.L. und Remington, J.S. (2002) Inhibition of secretion of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor alpha by the ketolide antibiotic telithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3327-3330.

Arch, R.H., Gedrich, R.W. und Thompson, C.B. (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* **12**: 2821-2830.

Arkusz, J., Ste Pnik, M., Trzaska, D., Dastych, J. und Rydzynski, K. (2006) Assessment of usefulness of J774A.1 macrophages for the assay of IL-1beta promoter activity. *Toxicol In Vitro* **20**: 109-116.

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Bare, O., Auron, P.E., Stevenson, M.A. und Calderwood, S.K. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* **277**: 15028-15034.

Baldassare, J.J., Bi, Y. und Bellone, C.J. (1999) The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. *J Immunol* **162**: 5367-5373.

Ballow, C.H. und Amsden, G.W. (1992) Azithromycin: the first azalide antibiotic. *Ann Pharmacother* **26**: 1253-1261.

Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M. und Anderson, D.W. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13681-13686.

Bertho, G., Gharbi-Benarous, J., Delaforge, M., Lang, C., Parent, A. und Girault, J.P. (1998) Conformational analysis of ketolide, conformations of RU 004 in solution and bound to bacterial ribosomes. *J Med Chem* **41**: 3373-3386.

Beutler, B. (2004) Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* **40**: 845-859.

Bevilacqua, A., Ceriani, M.C., Capaccioli, S. und Nicolin, A. (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* **195**: 356-372.

Beyaert, R., Cuenda, A., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Lee, J.C., Haegeman, G., Cohen, P. und Fiers, W. (1996) The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* **15**: 1914-1923.

Bochud, P.Y. und Calandra, T. (2003) Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Bmj* **326**: 262-266.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. und Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* **15**: 749-795.

Bonnet, M. und Van der Auwera, P. (1992) In vitro and in vivo intraleukocytic accumulation of azithromycin (CP-62, 993) and its influence on ex vivo leukocyte chemiluminescence. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 1302-1309.

Bosnar, M., Kelneric, Z., Munic, V., Erakovic, V. und Parnham, M.J. (2005) Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2372-2377.

Brook, M., Sully, G., Clark, A.R. und Saklatvala, J. (2000) Regulation of tumour necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. *FEBS Lett* **483**: 57-61.

Bryskier, A. (1997) Novelties in the field of macrolides. *Expert Opin Investig Drugs* **6**: 1697-1709.

Bryskier, A. (1998) Roxithromycin: review of its antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother* **41 Suppl B**: 1-21.

Bryskier, A. (2000) Ketolides-telithromycin, an example of a new class of antibacterial agents. *Clin Microbiol Infect* **6**: 661-669.

Bucher, M., Ittner, K.P., Hobbhahn, J., Taeger, K. und Kurtz, A. (2001) Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis. *Hypertension* **38**: 177-182.

Caivano, M. und Cohen, P. (2000) Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages. *J Immunol* **164**: 3018-3025.

Calandra, T., Bochud, P.Y. und Heumann, D. (2002) Cytokines in septic shock. *Curr Clin Top Infect Dis* **22**: 1-23.

Chan, E.D. und Riches, D.W. (1998) Potential role of the JNK/SAPK signal transduction pathway in the induction of iNOS by TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **253**: 790-796.

Chang, L. und Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37-40.

Chen, C.C. und Wang, J.K. (1999) p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol* **55**: 481-488.

Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C. und Cobb, M.H. (2001) MAP kinases. *Chem Rev* **101**: 2449-2476.

Chignard, M. und Balloy, V. (2000) Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: L1083-1090.

Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.

Chu, D.T. (1999) Recent developments in macrolides and ketolides. *Curr Opin Microbiol* **2**: 467-474.

Clancy, R.M., Amin, A.R. und Abramson, S.B. (1998) The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* **41**: 1141-1151.

Clark, R.A. (1999) Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* **179 Suppl 2**: S309-317.

Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**: 14843-14846.

Cogswell, J.P., Godlevski, M.M., Wisely, G.B., Clay, W.C., Leesnitzer, L.M., Ways, J.P. und Gray, J.G. (1994) NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J Immunol* **153**: 712-723.

Davis, R.J. (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* **42**: 459-467.

Dean, J.L., Brook, M., Clark, A.R. und Saklatvala, J. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem* **274**: 264-269.

Dedon, P.C. und Tannenbaum, S.R. (2004) Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem Biophys* **423**: 12-22.

Desaki, M., Takizawa, H., Ohtoshi, T., Kasama, T., Kobayashi, K., Sunazuka, T., Omura, S., Yamamoto, K. und Ito, K. (2000) Erythromycin suppresses nuclear factor-kappaB and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 124-128.

Dinarello, C.A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**: 2095-2147.

Dinarello, C.A. (1997) Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**: 253-265.

Dinarello, C.A. (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**: 503-508.

Dong, C., Davis, R.J. und Flavell, R.A. (2001) Signaling by the JNK group of MAP kinases. c-jun N-terminal Kinase. *J Clin Immunol* **21**: 253-257.

Dong, C., Davis, R.J. und Flavell, R.A. (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **20**: 55-72.

Douthwaite, S., Hansen, L.H. und Mauvais, P. (2000) Macrolide-ketolide inhibition of MLS-resistant ribosomes is improved by alternative drug interaction with domain II of 23S rRNA. *Mol Microbiol* **36**: 183-193.

Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J. und Saltiel, A.R. (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7686-7689.

Dunne, A. und O'Neill, L.A. (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* **2003**: re3.

Dunne, A. und O'Neill, L.A. (2005) Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett* **579**: 3330-3335.

Duong, M., Simard, M., Bergeron, Y. und Bergeron, M.G. (2001) Kinetic study of the inflammatory response in *Streptococcus pneumoniae* experimental pneumonia treated with the ketolide HMR 3004. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 252-262.

Egger, G. (2005) Die akute Entzündung. *Springer-Verlag, Wien – New York*.

English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S. und Cobb, M.H. (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* **253**: 255-270.

Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. und Poxton, I.R. (2002) Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* **4**: 837-851.

Feghali, C.A. und Wright, T.M. (1997) Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* **2**: d12-26.

Felmingham, D. (2001) Microbiological profile of telithromycin, the first ketolide antimicrobial. *Clin Microbiol Infect* **7 Suppl 3**: 2-10.

Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., McMurray, D., Smith, D.E., Sims, J.E., Bird, T.A. und O'Neill, L.A. (2001) Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**: 78-83.

Fumimori, T., Honda, S., Migita, K., Hamada, M., Yoshimuta, T., Honda, J., Fukuda, T., Suzuki, R., Gotoh, M., Eguchi, K. und Aizawa, H. (2004) Erythromycin suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in rheumatoid synovial cells. *J Rheumatol* **31**: 436-441.

Futaki, N., Takahashi, S., Kitagawa, T., Yamakawa, Y., Tanaka, M. und Higuchi, S. (1997) Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by NS-398 in endotoxin shock rats in vivo. *Inflamm Res* **46**: 496-502.

Garavito, R.M. und DeWitt, D.L. (1999) The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* **1441**: 278-287.

Gaston, B., Drazen, J.M., Loscalzo, J. und Stamler, J.S. (1994) The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* **149**: 538-551.

Ghosh, S., May, M.J. und Kopp, E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**: 225-260.

Giamarellos-Bourboulis, E.J., Adamis, T., Laoutaris, G., Sabracos, L., Koussoulas, V., Mouktaroudi, M., Perrea, D., Karayannacos, P.E. und Giamarelou, H. (2004) Immunomodulatory clarithromycin treatment of experimental sepsis and acute pyelonephritis caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 93-99.

Giamarellos-Bourboulis, E.J., Baziaka, F., Antonopoulou, A., Koutoukas, P., Kousoulas, V., Sabracos, L., Panagou, C., Perrea, D. und Giamarelou, H. (2005) Clarithromycin co-administered with amikacin attenuates systemic inflammation in experimental sepsis with *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* **25**: 168-172.

Gladue, R.P., Bright, G.M., Isaacson, R.E. und Newborg, M.F. (1989) In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 277-282.

Godambe, S.A., Chaplin, D.D., Takova, T. und Bellone, C.J. (1994) An NFIL-6 sequence near the transcriptional initiation site is necessary for the lipopolysaccharide induction of murine interleukin-1 beta. *DNA Cell Biol* **13**: 561-569.

Goeddel, D.V., Aggarwal, B.B., Gray, P.W., Leung, D.W., Nedwin, G.E., Palladino, M.A., Patton, J.S., Pennica, D., Shepard, H.M., Sugarman, B.J. und et al. (1986) Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 597-609.

Goldman, R.C. und Scaglione, F. (2004) The macrolide-bacterium interaction and its biological basis. *Curr Drug Targets Infect Disord* **4**: 241-260.

Gordon, S. (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**: 927-930.

Gotfried, M.H. (2004) Macrolides for the treatment of chronic sinusitis, asthma, and COPD. *Chest* **125**: 52S-60S; quiz 60S-61S.

Goyert, S.M., Ferrero, E., Rettig, W.J., Yenamandra, A.K., Obata, F. und Le Beau, M.M. (1988) The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science* **239**: 497-500.

Gray, J.G., Chandra, G., Clay, W.C., Stinnett, S.W., Haneline, S.A., Lorenz, J.J., Patel, I.R., Wisely, G.B., Furdon, P.J., Taylor, J.D. und et al. (1993) A CRE/ATF-like site in the upstream regulatory sequence of the human interleukin 1 beta gene is necessary for induction in U937 and THP-1 monocytic cell lines. *Mol Cell Biol* **13**: 6678-6689.

Green, R. und Noller, H.F. (1997) Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* **66**: 679-716.

Greenberg, S. und Grinstein, S. (2002) Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* **14**: 136-145.

Guha, M. und Mackman, N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* **13**: 85-94.

Gutierrez-Ramos, J.C. und Bluethmann, H. (1997) Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunol Today* **18**: 329-334.

Hansen, L.H., Mauvais, P. und Douthwaite, S. (1999) The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Mol Microbiol* **31**: 623-631.

Hardy, R.D., Rios, A.M., Chavez-Bueno, S., Jafri, H.S., Hatfield, J., Rogers, B.B., McCracken, G.H. und Ramilo, O. (2003) Antimicrobial and immunologic activities of clarithromycin in a murine model of *Mycoplasma pneumoniae*-induced pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1614-1620.

Harris, D.R., McGeachin, S.G. und Mills, H.H. (1965) The Structure And Stereochemistry Of Erythromycin A. *Tetrahedron Lett* **11**: 679-685.

Hata, A.N. und Breyer, R.M. (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* **103**: 147-166.

Hinz, B. und Brune, K. (1999) [COX-1 and COX-2: functions and pharmacological effects]. *Pharm Unserer Zeit* **28**: 21-29.

Hirano, T. (1992) Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin Immunol Immunopathol* **62**: S60-65.

Hirotani, T., Lee, P.Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S. und Takeda, K. (2005) The nuclear IkappaB protein IkappaBNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J Immunol* **174**: 3650-3657.

Ho, F.M., Lai, C.C., Huang, L.J., Kuo, T.C., Chao, C.M. und Lin, W.W. (2004) The anti-inflammatory carbazole, LCY-2-CHO, inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator expression through inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in macrophages. *Br J Pharmacol* **141**: 1037-1047.

Höcherl, K., Dreher, F., Kurtz, A. und Bucher, M. (2002) Cyclooxygenase-2 inhibition attenuates lipopolysaccharide-induced cardiovascular failure. *Hypertension* **40**: 947-953.

Homma, H., Yamanaka, A., Tanimoto, S., Tamura, M., Chijimatsu, Y., Kira, S. und Izumi, T. (1983) Diffuse panbronchiolitis. A disease of the transitional zone of the lung. *Chest* **83**: 63-69.

Homma, H. (1986) Diffuse panbronchiolitis. *Jpn J Med* **25**: 329-334.

Horng, T., Barton, G.M., Flavell, R.A. und Medzhitov, R. (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* **420**: 329-333.

Hotchkiss, R.S. und Karl, I.E. (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* **348**: 138-150.

Houin, G., Tillement, J.P., Lhoste, F., Rapin, M., Soussy, C.J. und Duval, J. (1980) Erythromycin pharmacokinetics in man. *J Int Med Res* **8 Suppl 2**: 9-14.

Hoyt, J.C. und Robbins, R.A. (2001) Macrolide antibiotics and pulmonary inflammation. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 1-7.

Hurme, M. und Matikainen, S. (1993) Okadaic acid, a phosphatase inhibitor, enhances the phorbol ester-induced interleukin-1 beta expression via an AP-1-mediated mechanism. *Scand J Immunol* **38**: 570-574.

Ianaro, A., Ialenti, A., Maffia, P., Sautebin, L., Rombola, L., Carnuccio, R., Iuvone, T., D'Acquisto, F. und Di Rosa, M. (2000) Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther* **292**: 156-163.

Ichikawa, Y., Koga, H., Tanaka, M., Nakamura, M., Tokunaga, N. und Kaji, M. (1990) Neutrophilia in bronchoalveolar lavage fluid of diffuse panbronchiolitis. *Chest* **98**: 917-923.

Ichikawa, Y., Ninomiya, H., Koga, H., Tanaka, M., Kinoshita, M., Tokunaga, N., Yano, T. und Oizumi, K. (1992) Erythromycin reduces neutrophils and neutrophil-derived elastolytic-like activity in the lower respiratory tract of bronchiolitis patients. *Am Rev Respir Dis* **146**: 196-203.

Ichikawa, Y., Hotta, M., Sumita, S., Fujimoto, K. und Oizumi, K. (1995) Reversible airway lesions in diffuse panbronchiolitis. Detection by high-resolution computed tomography. *Chest* **107**: 120-125.

Ichiyama, T., Nishikawa, M., Yoshitomi, T., Hasegawa, S., Matsubara, T., Hayashi, T. und Furukawa, S. (2001) Clarithromycin inhibits NF- $\kappa$ B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 44-47.

Imamura, Y., Yanagihara, K., Mizuta, Y., Seki, M., Ohno, H., Higashiyama, Y., Miyazaki, Y., Tsukamoto, K., Hirakata, Y., Tomono, K., Kadota, J. und Kohno, S. (2004) Azithromycin inhibits MUC5AC production induced by the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) homoserine lactone in NCI-H292 Cells. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3457-3461.

Inamura, K., Ohta, N., Fukase, S., Kasajima, N. und Aoyagi, M. (2000) The effects of erythromycin on human peripheral neutrophil apoptosis. *Rhinology* **38**: 124-129.

Iwata, M., Colby, T.V. und Kitaichi, M. (1994) Diffuse panbronchiolitis: diagnosis and distinction from various pulmonary diseases with centrilobular interstitial foam cell accumulations. *Hum Pathol* **25**: 357-363.

Janeway, C.A., Jr. und Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.

Jeon, Y.J., Han, S.H., Lee, Y.W., Lee, M., Yang, K.H. und Kim, H.M. (2000) Dexamethasone inhibits IL-1  $\beta$  gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF- $\kappa$ B/Rel and AP-1 activation. *Immunopharmacology* **48**: 173-183.

Johnson, G.L., Dohlman, H.G. und Graves, L.M. (2005) MAPK kinase kinases (MKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression. *Curr Opin Chem Biol* **9**: 325-331.

Jones, B.W., Heldwein, K.A., Means, T.K., Saukkonen, J.J. und Fenton, M.J. (2001) Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis* **60 Suppl 3**: iii6-12.

Kadota, J., Sakito, O., Kohno, S., Sawa, H., Mukae, H., Oda, H., Kawakami, K., Fukushima, K., Hiratani, K. und Hara, K. (1993) A mechanism of erythromycin treatment in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* **147**: 153-159.

Kanai, K., Asano, K., Hisamitsu, T. und Suzuki, H. (2004) Suppression of matrix metalloproteinase production from nasal fibroblasts by macrolide antibiotics in vitro. *Eur Respir J* **23**: 671-678.

Kaneko, Y., Yanagihara, K., Seki, M., Kuroki, M., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mukae, H., Tomono, K., Kadota, J. und Kohno, S. (2003) Clarithromycin inhibits overproduction of muc5ac core protein in murine model of diffuse panbronchiolitis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**: L847-853.

Kang, J.S., Yoon, Y.D., Lee, K.H., Park, S.K. und Kim, H.M. (2004) Costunolide inhibits interleukin-1 $\beta$  expression by down-regulation of AP-1 and MAPK activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **313**: 171-177.

Karin, M. und Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-663.

Katz, L., Brown, D., Boris, K. und Tuan, J. (1987) Expression of the macrolide-lincosamide-streptogramin-B-resistance methylase gene, ermE, from *Streptomyces erythraeus* in *Escherichia coli* results in N6-monomethylation and N6,N6-dimethylation of ribosomal RNA. *Gene* **55**: 319-325.

Katz, L. und Ashley, G.W. (2005) Translation and protein synthesis: macrolides. *Chem Rev* **105**: 499-528.

Kawakami, K., Kadota, J., Iida, K., Fujii, T., Shirai, R., Matsubara, Y. und Kohno, S. (1997) Phenotypic characterization of T cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood of patients with diffuse panbronchiolitis; the importance of cytotoxic T cells. *Clin Exp Immunol* **107**: 410-416.

Kawasaki, S., Takizawa, H., Ohtoshi, T., Takeuchi, N., Kohyama, T., Nakamura, H., Kasama, T., Kobayashi, K., Nakahara, K., Morita, Y. und Yamamoto, K. (1998) Roxithromycin inhibits cytokine production by and neutrophil attachment to human bronchial epithelial cells in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1499-1502.

Kawashima, M., yatsunami, J., Fukuno, Y., Nagata, M., Tominaga, M. und Hayashi, S. (2002) Inhibitory effects of 14-membered ring macrolide antibiotics on bleomycin-induced acute lung injury. *Lung* **180**: 73-89.

Kawazu, K., Kurokawa, M., Asano, K., Mita, A. und Adachi, M. (2000) Suppressive activity of a macrolide antibiotic, roxithromycin on co-stimulatory molecule expression on mouse splenocytes in vivo. *Mediators Inflamm* **9**: 39-43.

Keicho, N., Kudoh, S., Yotsumoto, H. und Akagawa, K.S. (1994) Erythromycin promotes monocyte to macrophage differentiation. *J Antibiot (Tokyo)* **47**: 80-89.

Keicho, N., Tokunaga, K., Nakata, K., Taguchi, Y., Azuma, A., Bannai, M., Emi, M., Ohishi, N., Yazaki, Y. und Kudoh, S. (1998) Contribution of HLA genes to genetic predisposition in diffuse panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* **158**: 846-850.

Keicho, N., Ohashi, J., Tamiya, G., Nakata, K., Taguchi, Y., Azuma, A., Ohishi, N., Emi, M., Park, M.H., Inoko, H., Tokunaga, K. und Kudoh, S. (2000) Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet* **66**: 501-507.

Keicho, N. und Kudoh, S. (2002) Diffuse panbronchiolitis: role of macrolides in therapy. *Am J Respir Med* **1**: 119-131.

Khan, A.A., Slifer, T.R., Araujo, F.G. und Remington, J.S. (1999) Effect of clarithromycin and azithromycin on production of cytokines by human monocytes. *Int J Antimicrob Agents* **11**: 121-132.

Kikuchi, T., Hagiwara, K., Honda, Y., Gomi, K., Kobayashi, T., Takahashi, H., Tokue, Y., Watanabe, A. und Nukiwa, T. (2002) Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF-kappa B transcription factors. *J Antimicrob Chemother* **49**: 745-755.

Kim, S.H., Kim, J. und Sharma, R.P. (2004) Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression. *Pharmacol Res* **49**: 433-439.

Kim, Y.W., Han, S.K., Shim, Y.S., Kim, K.Y., Han, Y.C., Seo, J.W. und Im, J.G. (1992) The first report of diffuse panbronchiolitis in Korea: five case reports. *Intern Med* **31**: 695-701.

Kirst, H.A. und Sides, G.D. (1989) New directions for macrolide antibiotics: pharmacokinetics and clinical efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 1419-1422.

Kirst, H.A. (1993) Semi-synthetic derivatives of erythromycin. *Prog Med Chem* **30**: 57-88.

Kishimoto, T. (1989) The biology of interleukin-6. *Blood* **74**: 1-10.

Knippers, R. (2001) Molekulare Genetik. *Thieme Verlag*, Stuttgart.

Kohri, K., Tamaoki, J., Kondo, M., Aoshiba, K., Tagaya, E. und Nagai, A. (2000) Macrolide antibiotics inhibit nitric oxide generation by rat pulmonary alveolar macrophages. *Eur Respir J* **15**: 62-67.

Komine, M., Kakinuma, T., Kagami, S., Hanakawa, Y., Hashimoto, K. und Tamaki, K. (2005) Mechanism of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 production and its modulation by roxithromycin. *J Invest Dermatol* **125**: 491-498.

Konno, S., Asano, K., Kurokawa, M., Ikeda, K., Okamoto, K. und Adachi, M. (1994) Antiasthmatic activity of a macrolide antibiotic, roxithromycin: analysis of possible mechanisms in vitro and in vivo. *Int Arch Allergy Immunol* **105**: 308-316.

Kopp, E., Medzhitov, R., Carothers, J., Xiao, C., Douglas, I., Janeway, C.A. und Ghosh, S. (1999) ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev* **13**: 2059-2071.

Kracht, M. und Saklatvala, J. (2002) Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine* **20**: 91-106.

Kroncke, K.D., Fehsel, K. und Kolb-Bachofen, V. (1995) Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**: 327-343.

Kudoh, S., Azuma, A., Yamamoto, M., Izumi, T. und Ando, M. (1998) Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J Respir Crit Care Med* **157**: 1829-1832.

Kudoh, S. und Keicho, N. (2003) Diffuse panbronchiolitis. *Semin Respir Crit Care Med* **24**: 607-618.

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

Labro, M.T. (2000) Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin Microbiol Rev* **13**: 615-650.

Labro, M.T., Babin-Chevaye, C. und Mergey, M. (2005) Accumulation of azithromycin and roxithromycin in tracheal epithelial fetal cell lines expressing wild type or mutated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein (CFTR). *J Chemother* **17**: 385-392.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lafontaine, D.L. und Tollervey, D. (2001) The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 514-520.

Lahti, A., Jalonens, U., Kankaanranta, H. und Moilanen, E. (2003) c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase inhibitor anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one reduces inducible nitric-oxide synthase expression by destabilizing mRNA in activated macrophages. *Mol Pharmacol* **64**: 308-315.

Lalak, N.J. und Morris, D.L. (1993) Azithromycin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* **25**: 370-374.

Lassman, H.B., Puri, S.K., Ho, I., Sabo, R. und Mezzino, M.J. (1988) Pharmacokinetics of roxithromycin (RU 965). *J Clin Pharmacol* **28**: 141-152.

Latz, E., Visintin, A., Lien, E., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Kurt-Jones, E.A., Golenbock, D.T. und Espevik, T. (2002) Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* **277**: 47834-47843.

Lebedeva, T.V. und Singh, A.K. (1997) Constitutive activity of the murine IL-1 beta promoter is regulated by a transcriptional repressor. *Biochim Biophys Acta* **1353**: 32-38.

Lecour, S., Maupoil, V., Siri, O., Tabard, A. und Rochette, L. (1999) Electron spin resonance detection of nitric oxide generation in major organs from LPS-treated rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **33**: 78-85.

Li, Y., Azuma, A., Takahashi, S., Usuki, J., Matsuda, K., Aoyama, A. und Kudoh, S. (2002) Fourteen-membered ring macrolides inhibit vascular cell adhesion molecule 1 messenger RNA induction and leukocyte migration: role in preventing lung injury and fibrosis in bleomycin-challenged mice. *Chest* **122**: 2137-2145.

Lin, H.C., Wang, C.H., Liu, C.Y., Yu, C.T. und Kuo, H.P. (2000) Erythromycin inhibits beta2-integrins (CD11b/CD18) expression, interleukin-8 release and intracellular oxidative metabolism in neutrophils. *Respir Med* **94**: 654-660.

Lin, N.T., Yang, F.L., Lee, R.P., Peng, T.C. und Chen, H.I. (2005) Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: The time course in conscious and septic rats. *Life Sci.*

Lindstrom, T.D., Hanssen, B.R. und Wrighton, S.A. (1993) Cytochrome P-450 complex formation by dirithromycin and other macrolides in rat and human livers. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 265-269.

Locksley, R.M., Killeen, N. und Lenardo, M.J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**: 487-501.

Lode, H., Borner, K., Koeppe, P. und Schaberg, T. (1996) Azithromycin--review of key chemical, pharmacokinetic and microbiological features. *J Antimicrob Chemother* **37 Suppl C**: 1-8.

Lonks, J.R. und Goldmann, D.A. (2005) Telithromycin: a ketolide antibiotic for treatment of respiratory tract infections. *Clin Infect Dis* **40**: 1657-1664.

Low, D.E., Felmingham, D., Brown, S.D., Rangaraju, M. und Nusrat, R. (2004) Activity of telithromycin against key pathogens associated with community-acquired respiratory tract infections. *J Infect* **49**: 115-125.

Männel, D.N., Janicke, R., Westenfelder, U., Echtenacher, B., Kist, A. und Falk, W. (1990) Tumor-induced tumor necrosis factor production in macrophages. *Lymphokine Res* **9**: 485-489.

Marom, Z.M. und Goswami, S.K. (1991) Respiratory mucus hypersecretion (bronchorrhea): a case discussion--possible mechanisms(s) and treatment. *J Allergy Clin Immunol* **87**: 1050-1055.

Martin, C.A. und Dorf, M.E. (1990) Interleukin-6 production by murine macrophage cell lines P388D1 and J774A.1: stimulation requirements and kinetics. *Cell Immunol* **128**: 555-568.

Matsuoka, N., Eguchi, K., Kawakami, A., Tsuboi, M., Kawabe, Y., Aoyagi, T. und Nagataki, S. (1996) Inhibitory effect of clarithromycin on costimulatory molecule expression and cytokine production by synovial fibroblast-like cells. *Clin Exp Immunol* **104**: 501-508.

Matsuzaka, Y., Tounai, K., Denda, A., Tomizawa, M., Makino, S., Okamoto, K., Keicho, N., Oka, A., Kulski, J.K., Tamiya, G. und Inoko, H. (2002) Identification of novel candidate genes in the diffuse panbronchiolitis critical region of the class I human MHC. *Immunogenetics* **54**: 301-309.

McGuire, J.M., Bunch, R.L., Anderson, R.C., Boaz, H.E., Flynn, E.H., Powell, H.M. und Smith, J.W. (1952) [Ilotycin, a new antibiotic.]. *Schweiz Med Wochenschr* **82**: 1064-1065.

Medzhitov, R. und Janeway, C.A., Jr. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**: 4-9.

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

Medzhitov, R. und Janeway, C., Jr. (2000) Innate immunity. *N Engl J Med* **343**: 338-344.

Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**: 135-145.

Menninger, J.R. und Otto, D.P. (1982) Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* **21**: 811-818.

Mikasa, K., Kita, E., Sawaki, M., Kunitatsu, M., Hamada, K., Konishi, M., Kashiba, S. und Narita, N. (1992) The anti-inflammatory effect of erythromycin in zymosan-induced peritonitis of mice. *J Antimicrob Chemother* **30**: 339-348.

Miyano, T., Ushikai, M., Matsune, S., Ueno, K., Katahira, S. und Kurono, Y. (2000) Effects of clarithromycin on cultured human nasal epithelial cells and fibroblasts. *Laryngoscope* **110**: 126-131.

Miyazaki, M., Zaitsu, M., Honjo, K., Ishii, E. und Hama, Y. (2003) Macrolide antibiotics inhibit prostaglandin E2 synthesis and mRNA expression of prostaglandin synthetic enzymes in human leukocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69**: 229-235.

Moazed, D. und Noller, H.F. (1987) Chloramphenicol, erythromycin, carbomycin and vernamycin B protect overlapping sites in the peptidyl transferase region of 23S ribosomal RNA. *Biochimie* **69**: 879-884.

Moncada, S., Palmer, R.M. und Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**: 109-142.

Moodie, S.A. und Wolfman, A. (1994) The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet* **10**: 44-48.

Morikawa, K., Watabe, H., Araake, M. und Morikawa, S. (1996) Modulatory effect of antibiotics on cytokine production by human monocytes in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1366-1370.

Morikawa, K., Zhang, J., Nonaka, M. und Morikawa, S. (2002) Modulatory effect of macrolide antibiotics on the Th1- and Th2-type cytokine production. *Int J Antimicrob Agents* **19**: 53-59.

Nagai, H., Shishido, H., Yoneda, R., Yamaguchi, E., Tamura, A. und Kurashima, A. (1991) Long-term low-dose administration of erythromycin to patients with diffuse panbronchiolitis. *Respiration* **58**: 145-149.

Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M. und Miyake, K. (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* **3**: 667-672.

Nakagawa, S., Kojio, S., Taneike, I., Iwakura, N., Tamura, Y., Kushiya, K., Gondaira, F. und Yamamoto, T. (2003) Inhibitory action of telithromycin against Shiga toxin and endotoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **310**: 1194-1199.

Namour, F., Wessels, D.H., Pascual, M.H., Reynolds, D., Sultan, E. und Lenfant, B. (2001) Pharmacokinetics of the new ketolide telithromycin (HMR 3647) administered in ascending single and multiple doses. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 170-175.

Nathan, C. und Xie, Q.W. (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**: 915-918.

Nathan, C. (2002) Points of control in inflammation. *Nature* **420**: 846-852.

Nelson, S., Summer, W.R., Terry, P.B., Warr, G.A. und Jakab, G.J. (1987) Erythromycin-induced suppression of pulmonary antibacterial defenses. A potential mechanism of superinfection in the lung. *Am Rev Respir Dis* **136**: 1207-1212.

Nilsen, O.G. (1995) Pharmacokinetics of macrolides. Comparison of plasma, tissue and free concentrations with special reference to roxithromycin. *Infection* **23 Suppl 1**: S5-9.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. und Steitz, T.A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**: 920-930.

Noller, H.F. (1984) Structure of ribosomal RNA. *Annu Rev Biochem* **53**: 119-162.

Oda, H., Kadota, J., Kohno, S. und Hara, K. (1995) Leukotriene B4 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. *Chest* **108**: 116-122.

Ohmori, S., Ishii, I., Kuriya, S., Taniguchi, T., Rikihisa, T., Hirose, S., Kanakubo, Y. und Kitada, M. (1993) Effects of clarithromycin and its metabolites on the mixed function oxidase system in hepatic microsomes of rats. *Drug Metab Dispos* **21**: 358-363.

Oishi, K., Sonoda, F., Kobayashi, S., Iwagaki, A., Nagatake, T., Matsushima, K. und Matsumoto, K. (1994) Role of interleukin-8 (IL-8) and an inhibitory effect of erythromycin on IL-8 release in the airways of patients with chronic airway diseases. *Infect Immun* **62**: 4145-4152.

Okamoto, T., Gohil, K., Finkelstein, E.I., Bove, P., Akaike, T. und van der Vliet, A. (2004) Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**: L198-209.

Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E.S., Young, D.W., Ishizaka, S.T., Rose, J., Chow, J.C. und Strauss, J.F., 3rd (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **276**: 10229-10233.

Oldenburg, H.S., Rogy, M.A., Lazarus, D.D., Van Zee, K.J., Keeler, B.P., Chizzonite, R.A., Lowry, S.F. und Moldawer, L.L. (1993) Cachexia and the acute-phase protein response in inflammation are regulated by interleukin-6. *Eur J Immunol* **23**: 1889-1894.

Oshikawa, K., Yanagisawa, K., Tominaga, S. und Sugiyama, Y. (2002) ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* **299**: 18-24.

Palsson-McDermott, E.M. und O'Neill, L.A. (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* **113**: 153-162.

Park, M.H., Kim, Y.W., Yoon, H.I., Yoo, C.G., Han, S.K., Shim, Y.S. und Kim, W.D. (1999) Association of HLA class I antigens with diffuse panbronchiolitis in Korean patients. *Am J Respir Crit Care Med* **159**: 526-529.

Park, S.J., Lee, Y.C., Rhee, Y.K. und Lee, H.B. (2004) The effect of long-term treatment with erythromycin on Th1 and Th2 cytokines in diffuse panbronchiolitis. *Biochem Biophys Res Commun* **324**: 114-117.

Parkin, J. und Cohen, B. (2001) An overview of the immune system. *Lancet* **357**: 1777-1789.

Pasare, C. und Medzhitov, R. (2005) Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* **560**: 11-18.

Poehlsgaard, J. und Douthwaite, S. (2005) The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol* **3**: 870-881.

Raetz, C.R. und Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**: 635-700.

Ralph, P., Moore, M.A. und Nilsson, K. (1976) Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med* **143**: 1528-1533.

Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**: 557-572.

Rankin, J.A. (2004) Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues* **15**: 3-17.

Reddy, R.C., Chen, G.H., Tateda, K., Tsai, W.C., Phare, S.M., Mancuso, P., Peters-Golden, M. und Standiford, T.J. (2001) Selective inhibition of COX-2 improves early survival in murine endotoxemia but not in bacterial peritonitis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**: L537-543.

Retsema, J. und Fu, W. (2001) Macrolides: structures and microbial targets. *Int J Antimicrob Agents* **18 Suppl 1**: S3-10.

Rios, A.M., Mejias, A., Chavez-Bueno, S., Fonseca-Aten, M., Katz, K., Hatfield, J., Gomez, A.M., Jafri, H.S., McCracken, G.H., Jr., Ramilo, O. und Hardy, R.D. (2004) Impact of cethromycin (ABT-773) therapy on microbiological, histologic, immunologic, and respiratory indices in a murine model of *Mycoplasma pneumoniae* lower respiratory infection. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2897-2904.

Robbins, R.A., Springall, D.R., Warren, J.B., Kwon, O.J., Buttery, L.D., Wilson, A.J., Adcock, I.M., Riveros-Moreno, V., Moncada, S., Polak, J. und et al. (1994) Inducible nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* **198**: 835-843.

Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J. und Seppala, H. (1999) Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2823-2830.

Robertson, M.J. (2002) Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* **71**: 173-183.

Rodrigues, A.D., Roberts, E.M., Mulford, D.J., Yao, Y. und Ouellet, D. (1997) Oxidative metabolism of clarithromycin in the presence of human liver microsomes. Major role for the cytochrome P4503A (CYP3A) subfamily. *Drug Metab Dispos* **25**: 623-630.

Rodvold, K.A. (1999) Clinical pharmacokinetics of clarithromycin. *Clin Pharmacokinet* **37**: 385-398.

Roux, P.P. und Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 320-344.

Rubin, B.K. und Henke, M.O. (2004) Immunomodulatory activity and effectiveness of macrolides in chronic airway disease. *Chest* **125**: 70S-78S.

Rubin, B.K. und Tamaoki, J. (2005) Antibiotics as anti-inflammatory and immunomodulatory agents. *Birkhäuser Verlag, Basel – Boston – Berlin*.

Ruckdeschel, K., Mannel, O., Richter, K., Jacobi, C.A., Trulzsch, K., Rouot, B. und Heesemann, J. (2001) Yersinia outer protein P of Yersinia enterocolitica simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol* **166**: 1823-1831.

Sakito, O., Kadota, J., Kohno, S., Abe, K., Shirai, R. und Hara, K. (1996) Interleukin 1 beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis: a potential mechanism of macrolide therapy. *Respiration* **63**: 42-48.

Salkowski, C.A., Detore, G., McNally, R., van Rooijen, N. und Vogel, S.N. (1997) Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide production by lipopolysaccharide in vivo: the roles of macrophages, endogenous IFN-gamma, and TNF receptor-1-mediated signaling. *J Immunol* **158**: 905-912.

Sanz, M.J., Nabah, Y.N., Cerdá-Nicolas, M., O'Connor, J.E., Issekutz, A.C., Cortijo, J. und Morcillo, E.J. (2005) Erythromycin exerts in vivo anti-inflammatory activity downregulating cell adhesion molecule expression. *Br J Pharmacol* **144**: 190-201.

Sass, G., Heinlein, S., Agli, A., Bang, R., Schumann, J. und Tiegs, G. (2002) Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. *Cytokine* **19**: 115-120.

Scaglione, F. und Rossoni, G. (1998) Comparative anti-inflammatory effects of roxithromycin, azithromycin and clarithromycin. *J Antimicrob Chemother* **41 Suppl B**: 47-50.

Schnare, M., Barton, G.M., Holt, A.C., Takeda, K., Akira, S. und Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2**: 947-950.

Schönenfeld, W. und Kirst, H.A. (2002) Macrolide antibiotics. *Birkhäuser Verlag, Basel – Boston – Berlin*.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. und Hume, D.A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**: 163-189.

Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S. und Ulevitch, R.J. (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**: 1429-1431.

Schumann, R.R. (1992) Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res Immunol* **143**: 11-15.

Serkkola, E. und Hurme, M. (1993) Synergism between protein-kinase C and cAMP-dependent pathways in the expression of the interleukin-1 beta gene is mediated via the activator-protein-1 (AP-1) enhancer activity. *Eur J Biochem* **213**: 243-249.

Shaulian, E. und Karin, M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**: E131-136.

Shi, Y. und Gaestel, M. (2002) In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance. *Biol Chem* **383**: 1519-1536.

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

Shimizu, T., Shimizu, S., Hattori, R., Gabazza, E.C. und Majima, Y. (2003) In vivo and in vitro effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* **168**: 581-587.

Shirai, T., Sato, A. und Chida, K. (1995) Effect of 14-membered ring macrolide therapy on chronic respiratory tract infections and polymorphonuclear leukocyte activity. *Intern Med* **34**: 469-474.

Siddiqui, J. (2004) Immunomodulatory effects of macrolides: implications for practicing clinicians. *Am J Med* **117 Suppl 9A**: 26S-29S.

Sims, J.E. und Dower, S.K. (1994) Interleukin-1 receptors. *Eur Cytokine Netw* **5**: 539-546.

Smith, P.D., Ochsenbauer-Jambor, C. und Smythies, L.E. (2005) Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* **206**: 149-159.

Smith, W.L., DeWitt, D.L. und Garavito, R.M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**: 145-182.

Speyer, C.L., Neff, T.A., Warner, R.L., Guo, R.F., Sarma, J.V., Riedemann, N.C., Murphy, M.E., Murphy, H.S. und Ward, P.A. (2003) Regulatory effects of iNOS on acute lung inflammatory responses in mice. *Am J Pathol* **163**: 2319-2328.

Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M. und Ben-Neriah, Y. (1994) JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* **77**: 727-736.

Su, B. und Karin, M. (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* **8**: 402-411.

Sugiyama, Y., Kudoh, S., Maeda, H., Suzuki, H. und Takaku, F. (1990) Analysis of HLA antigens in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* **141**: 1459-1462.

Suzuki, H., Asano, K., Ohki, S., Kanai, K., Mizutani, T. und Hisamitsu, T. (1999) Suppressive activity of a macrolide antibiotic, roxithromycin, on pro-inflammatory cytokine production in vitro and in vivo. *Mediators Inflamm* **8**: 199-204.

Suzuki, H. und Ikeda, K. (2002) Mode of action of long-term low-dose macrolide therapy for chronic sinusitis in the light of neutrophil recruitment. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **1**: 117-126.

Suzuki, M., Asano, K., Yu, M., Hisamitsu, T. und Suzuki, H. (2002) Inhibitory action of a macrolide antibiotic, roxithromycin, on co-stimulatory molecule expressions in vitro and in vivo. *Mediators Inflamm* **11**: 235-244.

Szarka, R.J., Wang, N., Gordon, L., Nation, P.N. und Smith, R.H. (1997) A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. *J Immunol Methods* **202**: 49-57.

Takahashi, S., Futaki, N., Yokoyama, M., Yamakawa, Y., Arai, I., Higuchi, S. und Otomo, S. (1995) Expression of prostaglandin H synthase-2 in endotoxic shock induced in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **330**: 102-115.

Takeda, K., Kaisho, T. und Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 335-376.

Takeda, K. und Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**: 1-14.

Takizawa, H., Desaki, M., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Kohyama, T., Sato, M., Tanaka, M., Kasama, T., Kobayashi, K., Nakajima, J. und Ito, K. (1997) Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* **156**: 266-271.

Tamaoki, J., Takeyama, K., Tagaya, E. und Konno, K. (1995) Effect of clarithromycin on sputum production and its rheological properties in chronic respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1688-1690.

Tamaoki, J., Kondo, M., Kohri, K., Aoshiba, K., Tagaya, E. und Nagai, A. (1999) Macrolide antibiotics protect against immune complex-induced lung injury in rats: role of nitric oxide from alveolar macrophages. *J Immunol* **163**: 2909-2915.

Terao, H., Asano, K., Kanai, K., Kyo, Y., Watanabe, S., Hisamitsu, T. und Suzuki, H. (2003) Suppressive activity of macrolide antibiotics on nitric oxide production by lipopolysaccharide stimulation in mice. *Mediators Inflamm* **12**: 195-202.

Thiernemann, C. (1997) Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol* **29**: 159-166.

Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J. und et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**: 768-774.

Tong, L., Pav, S., White, D.M., Rogers, S., Crane, K.M., Cywin, C.L., Brown, M.L. und Pargellis, C.A. (1997) A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nat Struct Biol* **4**: 311-316.

Tormakangas, L., Saario, E., Bem David, D., Bryskier, A., Leinonen, M. und Saikku, P. (2004) Treatment of acute Chlamydia pneumoniae infection with telithromycin in C57BL/6J mice. *J Antimicrob Chemother* **53**: 1101-1104.

Trinchieri, G. (1989) Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* **47**: 187-376.

Tsai, W.C., Rodriguez, M.L., Young, K.S., Deng, J.C., Thannickal, V.J., Tateda, K., Hershenson, M.B. und Standiford, T.J. (2004) Azithromycin blocks neutrophil recruitment in Pseudomonas endobronchial infection. *Am J Respir Crit Care Med* **170**: 1331-1339.

Twigg, H.L., 3rd (2004) Macrophages in innate and acquired immunity. *Semin Respir Crit Care Med* **25**: 21-31.

Uchiyama, H. und Weisblum, B. (1985) N-Methyl transferase of *Streptomyces erythraeus* that confers resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics: amino acid sequence and its homology to cognate R-factor enzymes from pathogenic bacilli and cocci. *Gene* **38**: 103-110.

Ulevitch, R.J. und Tobias, P.S. (1999) Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* **11**: 19-22.

Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C.J., Issels, R.D. und Wagner, H. (2002) HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* **277**: 15107-15112.

Van De Parre, T.J., Martinet, W., Schrijvers, D.M., Herman, A.G. und De Meyer, G.R. (2005) mRNA but not plasmid DNA is efficiently transfected in murine J774A.1 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **327**: 356-360.

Vane, J.R., Bakhle, Y.S. und Botting, R.M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 97-120.

Vazifeh, D., Abdelghaffar, H. und Labro, M.T. (1997) Cellular accumulation of the new ketolide RU 64004 by human neutrophils: comparison with that of azithromycin and roxithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2099-2107.

Viriyakosol, S., Tobias, P.S., Kitchens, R.L. und Kirkland, T.N. (2001) MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **276**: 38044-38051.

Visintin, A., Latz, E., Monks, B.G., Espevik, T. und Golenbock, D.T. (2003) Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem* **278**: 48313-48320.

Vollmar, A. und Dingermann, T. (2005) Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart*.

Weisblum, B. (1995) Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 577-585.

Westphal, J.F. (2000) Macrolide - induced clinically relevant drug interactions with cytochrome P-450A (CYP) 3A4: an update focused on clarithromycin, azithromycin and dirithromycin. *Br J Clin Pharmacol* **50**: 285-295.

Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C.Y., Shyu, A.B., Muller, M., Gaestel, M., Resch, K. und Holtmann, H. (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J* **18**: 4969-4980.

Wolkow, P.P. (1998) Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm Res* **47**: 152-166.

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

Yanagihara, K., Tomono, K., Kuroki, M., Kaneko, Y., Sawai, T., Ohno, H., Miyazaki, Y., Higashiyama, Y., Maesaki, S., Kadota, J. und Kohno, S. (2000) Intrapulmonary concentrations of inflammatory cytokines in a mouse model of chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Exp Immunol* **122**: 67-71.

Yanagihara, K., Kadoto, J. und Kohno, S. (2001) Diffuse panbronchiolitis--pathophysiology and treatment mechanisms. *Int J Antimicrob Agents* **18 Suppl 1**: S83-87.

Yatsunami, J., Tsuruta, N., Fukuno, Y., Kawashima, M., Taniguchi, S. und Hayashi, S. (1999) Inhibitory effects of roxithromycin on tumor angiogenesis, growth and metastasis of mouse B16 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* **17**: 119-124.

Zacharowski, K., Frank, S., Otto, M., Chatterjee, P.K., Cuzzocrea, S., Hafner, G., Pfeilschifter, J. und Thiemermann, C. (2000) Lipoteichoic acid induces delayed protection in the rat heart: A comparison with endotoxin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 1521-1528.

Zhanel, G.G. und Hoban, D.J. (2002) Ketolides in the treatment of respiratory infections. *Expert Opin Pharmacother* **3**: 277-297.

Zhanel, G.G., Walters, M., Noreddin, A., Vercaigne, L.M., Wierzbowski, A., Embil, J.M., Gin, A.S., Douthwaite, S. und Hoban, D.J. (2002) The ketolides: a critical review. *Drugs* **62**: 1771-1804.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ab	<i>antibody</i>
Act D	Actinomycin D
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMP	Ampicillin
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APC	<i>antigen presenting cells</i> (antigenpräsentierende Zellen)
ATF2	<i>activating transcription factor 2</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AZM	Azithromycin
BALF	<i>bronchoalveolar lavage fluid</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	Clarithromycin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
COX	Cyclooxygenase
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
Da	Dalton
DD	<i>death domain</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DPB	Diffuse Panbronchiolitis
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethyldiaminteraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Elk-1	<i>Elk1 member of ETS oncogene family</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>

HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HSP	Hitzeschockprotein
I $\kappa$ B	<i>inhibitory <math>\kappa</math>B</i>
ICAM-1	<i>intracellular cell adhesion molecule-1</i>
ICE	<i>interleukin converting enzyme</i>
IEG	<i>immediate early gene</i>
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgE	Immunglobulin E
IKK	<i>inhibitory <math>\kappa</math>B kinase</i>
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
i.p.	intraperitoneal
IRAK	<i>IL-1 receptor associated kinase</i> (IL-1-Rezeptor-assozierte Kinase)
i.v.	intravenös
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K-EDTA	Kalium-EDTA
kg	Kilogramm
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LBP	<i>lipopolysaccharide binding protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Regionen
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase)
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation-2</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MIP-1 $\alpha$	<i>macrophage inflammatory protein-1<math>\alpha</math></i>
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
MLK	<i>mixed lineage kinase</i>
MLS	Makrolid-Lincosamin-Streptogramin
mM	millimolar
$\mu$ M	mikromolar
M-MLV	<i>Murine-Moloney-Leukemia-Virus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation protein 88</i>

n	Anzahl
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
NF-IL6	<i>nuclear factor for IL-6</i>
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pg	Picogramm
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
6-keto PGF <sub>1α</sub>	6-keto Prostaglandin F <sub>1α</sub>
PMN	polymorphkernige neutrophile Leukozyten
pmol	Picomol
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RXM	Roxithromycin
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit
SAPK/JNK	<i>stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TAK1	<i>transforming growth factor-β activated kinase</i>
TAO	“thousand and one kinases”
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,05 % Tween 20
TEL	Telithromycin
TIR	<i>Toll/IL-1R domain</i>
TIRAP	<i>TIR domain containing adaptor protein</i>
TLR	Toll-like Rezeptor

TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> (Tumor-Nekrose Faktor $\alpha$ )
TRAF6	<i>tumor necrosis factor receptor associated factor 6</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tRNA	transfer RNA
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen pro Volumen)
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
w/v	<i>weight/volume</i> (Masse pro Volumen)

## PUBLIKATIONEN

### Originalpublikationen

Kuehnel, T.S., Schurr, C., Lotter, K. und Kees, F. (2005) Penetration of telithromycin into the nasal mucosa and ethmoid bone of patients undergoing rhinosurgery for chronic sinusitis. *J Antimicrob Chemother* **55**: 591-594.

### Eingereichte Manuskripte

Lotter, K., Höcherl, K., Bucher, M. und Kees, F. In vivo efficacy of telithromycin on cytokine and nitric oxide formation in lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation in mice. *J Antimicrob Chemother* (in review)

### Eingereichte Poster

Lotter, K., Höcherl, K. und Kees, F. Macrolides and ketolides suppress LPS-induced cytokine expression by inhibition of JNK and p38 MAP kinases in J-774A.1 macrophages. 47. *Frühjahrstagung der DGPT (Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie) vom 4. bis 6. April 2006 in Mainz*

## DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Frieder Kees möchte ich meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Er hat mir durch die Vergabe des interessanten Themas die Möglichkeit gegeben, mein Promotionsvorhaben auch während der Vakanz am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie verwirklichen zu können. Seine stete Hilfsbereitschaft bei Fragen, seine Anregungen und Vorschläge und nicht zuletzt sein einzigartiger Humor haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Roland Seifert möchte ich danken, dass er mir als neuer Inhaber des Lehrstuhls für Pharmakologie und Toxikologie ausreichend Zeit gab, alle praktischen und theoretischen Arbeiten abschließen zu können. Hilfreich waren auch seine Anregungen zur Anfertigung der Dissertationsschrift.

Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz danke ich für die stete Kooperationsbereitschaft und die freundliche Einführung in seinen Arbeitskreis am Lehrstuhl für Physiologie I. Diese Zusammenarbeit ermöglichte mir die Einarbeitung in molekularbiologische Arbeitsweisen.

Herrn PD Dr. Klaus Höcherl möchte ich für seine Bereitschaft danken, mich ungeachtet des eigenen Arbeitspensums bei der Durchführung der Tierversuche und der Diskussion der Ergebnisse zu unterstützen. Ich danke ihm auch für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn PD Dr. Michael Bucher möchte ich für die hilfreichen Ratschläge bei theoretischen und praktischen Problemen danken.

Herrn Dr. Jürgen Klar danke ich für die Einführung in die Gentechnologie. Seine praktischen Anleitungen und die stete Diskussionsbereitschaft waren eine wertvolle Hilfe bei der Generierung der Promotorkonstrukte.

Meiner Kollegin Frau Corina Hensel danke ich für ihre wissenschaftlichen und auch nicht-wissenschaftlichen Anregungen, Ratschläge und Diskussionen, die mich nach manchem misslungenen Experiment aufgemuntert haben.

Bei Frau Gertraud Wilberg, Frau Katharina Wohlfart, Frau Maria Hirblinger und Frau Astrid Seefeld möchte ich mich für die technische Unterstützung und Anleitung bei der Analytik bedanken. Frau Rita Prenzyna danke ich für das angenehme und freundliche Klima am Lehrstuhl.

Für die gute Zusammenarbeit im Labor und die lockere Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen anderen namentlich nicht erwähnten Mitgliedern des Lehrstuhls für Pharmakologie und Toxikologie sowie des Lehrstuhls für Physiologie I bedanken.

Schließlich möchte ich ganz herzlich meinen Eltern danken, die mir während meines Studiums und während der Promotion immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Das Gelingen dieser Arbeit ist nicht minder ihr Verdienst!

## LEBENSLAUF

### Name

Kristina Therese Lotter

### Persönliche Daten

geboren am 19.06.1977 in Nabburg, ledig

### Beruflicher Werdegang

08/2002 – heute	Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Regensburg, Doktorandin
07/2002	Pharmazeutische Prüfung, Approbation als Apothekerin
05/2001 – 04/2002	STERN-Apotheke, Regenstauf, Pharmaziepraktikantin

### Studium

11/1996 – 03/2001	Universität Regensburg, Studium der Pharmazie
28.03.2001	Abschluss: Zweites Staatsexamen

### Schulische Ausbildung

09/1987 – 06/1996	Max-Reger-Gymnasium, Amberg
28.06.1996	Abitur
09/1983 – 06/1987	Grundschule Schnaittenbach

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den \_\_\_\_\_

---

Kristina Lotter