

Universität Ulm
Medizinische Fakultät

Einfluss der Apoptose auf die Inflammation der Lunge im
Rahmen der akuten septischen Lungenschädigung

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Vorgelegt von
Christoph Hohmann
aus Eisenach
2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Dietl
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Anita Ignatius
Tag der Promotion: 12.10.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Definition und Epidemiologie des akuten Lungenschadens.....	1
1.2. Definition und Epidemiologie der Sepsis	2
1.3. Trauma als Auslöser von Sepsis und akutem Lungenschaden.....	4
1.4. Das <i>double-hit</i> -Modell des thoraxtraumainduzierten polymikrobiellen akuten Lungenschadens	5
1.5. Der Pathomechanismus von Akutem Lungenschaden und Sepsis	6
1.6. Die Rolle der apoptotischen Zellen und ihrer Phagozytose in der pulmonalen Immunmodulation	8
1.7. Apoptotische Zellen und akuter Lungenschaden.....	10
1.8. Zielsetzung der Arbeit.....	11
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Puffer, Lösungen und Medien	13
2.2. Kommerziell erhältliche Kits.....	13
2.3. Analytische/präparative Geräte	14
2.4. Verwendete Software	15
2.5. Zelllinien und Kulturmedien	15
2.6. Tierexperimentelle Arbeiten	20
2.7. Histologische Analysen	31
2.8. Mikroskopische Beurteilungen	33
2.9. Statistik	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1. Apoptose-Induktion an Maus-Lungen-Epithelzellen	35
3.2. Nekrose-Induktion an Maus-Lungen-Epithelzellen	38
3.3. Dosisfindung zur <i>in vivo</i> Applikation apoptotischer, nekrotischer und vitaler Maus- Lungen Epithelzellen.....	38
3.4. Instillation von Lungenhomogenat in die akut geschädigte Lunge nach <i>double-hit</i> (6 h).....	49
3.5. Instillation von apoptotischen/nekrotischen Maus-Lungen-Epithelzellen oder Lungenhomogenat in die traumatisierte Mauslunge 12).....	54
3.6. Instillation einer geringen oder hohen Anzahl apoptotischer/nekrotischer MLE12- Zellen in einem therapeutischen Ansatz im Rahmen des ALI-Mausmodells.....	61

4. Diskussion.....	74
4.1. UV-C induziert eine hohe Apoptose-Rate an Maus-Lungen-Epithelzellen.....	74
4.2. Die Instillation apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen in die gesunde Maus- lunge induziert eine selektive (lokale) transiente inflammatorische Reaktion.....	75
4.3. Die Instillation von Lungenhomogenat und einer sehr hohen Anzahl nekrotischer Maus-Lungen-Epithelzellen (1×10^8) in die gesunde Mauslunge induziert einen kurz- zeitigen Anstieg inflammatorischer Mediatoren.....	81
4.4. Die Instillation von Lungenhomogenat nach der Induktion einer thoraxtrauma- induzierten septischen Lungenschädigung führt zu einer Verstärkung der beobach- teten Entzündungsantwort in Plasma und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit....	84
4.5. Die Instillation von apoptotischen Zellen in die traumatisierte Mauslunge führt 12 h nach Trauma zu einer verminderten systemischen Entzündungsreaktion	87
4.6. Die Instillation von apoptotischen/nekrotischen Zellen im Rahmen des ALI-Modells in der Maus führt zu einer differenzierten Veränderung der Entzündung in Abhängigkeit von der verwendeten Zellzahl.....	92
4.7. Grenzen der vorliegenden Studien und Implikationen für nachfolgende Unter- suchungen.....	96
5. Zusammenfassung.....	98
6. Literaturverzeichnis.....	100
Anhang	116
Danksagung	115
Lebenslauf.....	113

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AECC	<i>American European Consensus Conference</i>
ALI	<i>Acute Lung Injury</i>
AM	Alveolarmakrophagen
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AT2-Zellen	Alveolar-Typ 2-Epithelzellen
BAL/BALF	bronchoalveoläre Lavage(-flüssigkeit)
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CCL2	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2 (= MCP-1)</i>
CCL3	<i>chemokine (C-C motif) ligand 3 (= MIP-1α)</i>
CCR2	<i>chemokine (C-C motif) receptor 2</i>
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i> (Zökale Ligatur und Punktion)
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein Diazetat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRT	Calreticulin
CXCL1	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (= CINC-1 / KC)</i>
CXCL2/3	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 2/3 (= MIP-2)</i>
CXCR2	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 2</i>
DAMP	<i>Danger Associated Molecular Pattern</i>
DH	<i>double hit</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DBPS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELR	Glutamat-Leucin-Arginin Motiv

et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	<i>gravity</i> (Erdbeschleunigung)
h	<i>hour</i> (Stunde)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGB-1	<i>high-mobility-group-protein-1</i>
HPF	<i>high-power-field</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
ICAM-1	interzelluläre Adhäsionsmolekül-1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KC	<i>keratinocyte-derived chemokine</i> (= CXCL1)
l	Liter
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i> (= CCL2)
min	Minute/ minütig
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein-1α</i> (= CCL3)
MIP-2	<i>macrophage inflammatory protein-2</i> (= CXCL2/3)
MODS	<i>multi organ dysfunction syndrome</i> (Multiorganversagen)
MPO	Myeloperoxidase
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NET	<i>nuclear extraellular traps</i>
NHLBI	<i>National Heart, Lung and Blood Institute</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck in mmHg

PaO/FiO ₂	Horowitz-Index
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium-Iodid
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end-products</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i> (= CCL5)
RIPK3	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK-1	Rho-assoziierte Kinase-1
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Standard-Zellkulturmedium; am Roswell Park Memorial Institute entwickelt
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
Sham	vorgetäuschter Eingriff als Kontrolle
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SNK	Student-Newman-Keuls
ST-2	<i>receptor supression of tomorigenicity</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRALI	Transfusions-assoziierte akute Lungenentzündung
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
TxT	Thoraxtrauma
UV-c	Ultraviolette Strahlung im Bereich der Wellenlänge von 200-280 nm
7-AAD	7- Aminoactinomycin

1. Einleitung

1.1. Definition und Epidemiologie des akuten Lungenschadens

Im Jahr 1967 publizierten Ashbaugh et al. die erste Fallstudie mit 12 Patienten, in der sie unter anderem das pathologische Erscheinungsbild des *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) beschrieben. ARDS wird seitdem charakterisiert durch Tachypnoe, schwere Hypoxämie, verringerte respiratorische *Compliance* und eine auf dem Röntgenbild des Brustkorbs sichtbare Lungengewebsschädigung [7]. Obwohl eine diffuse alveolare Schädigung den hauptsächlichsten pathologischen Prozess darstellt [173], basiert die Diagnose von ARDS auf der klinischen Charakterisierung. Die klinischen Merkmale wurden das erste Mal umfassend in den *American European Consensus Conference* (AECC)-Kriterien formalisiert [18]. Im Jahr 2012 wurden die Kriterien noch einmal in der sogenannten „Berlin-Definition“ konkretisiert. Die letztgenannten Kriterien erwiesen sich insbesondere hinsichtlich der Validität einer Prognose der Mortalität als geeigneter als die bis dahin verwendeten AECC-Kriterien [138]. Die neue Definition sieht vor, dass drei Kategorien der ARDS, basierend auf dem Schweregrad der Hypoxämie, unterschieden werden [138]. Diese Kategorien werden als milde ($200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$), moderate ($100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$) und schwere ARDS ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$) bezeichnet [138]. Die in diesem Kontext missverständliche Bezeichnung *Acute Lung Injury* (ALI), die zum Teil für Patienten mit einem $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Quotienten zwischen 200 mmHg und 300 mmHg, teilweise aber auch für alle ARDS-Patienten als Oberbegriff benutzt wurde, entfällt in der neuen Definition. Die noch in der AECC Definition verwendeten Variablen des radiographischen Schweregrades, der *Compliance* des respiratorischen Systems, des positiven end-expiratorischen Drucks und des Expirationsvolumens/Minute finden in der „Berlin-Definition“ keine Berücksichtigung mehr [138]. In der vorliegenden Arbeit wird aus Gründen der Reproduzierbarkeit in Bezug auf vorangegangene Arbeiten zum verwendeten Mausmodell der akuten Lungenschädigung mit dem Terminus ALI operiert.

Die Inzidenz der akuten Lungenschädigung variiert von 17,9 Patienten pro 100.000 Personen/Jahr für ALI (hier liegen noch die AECC-Kriterien zugrunde) und 13,5 Patienten pro 100.000 Personen/Jahr für ARDS in Skandinavien [105], bis hin zu 78,9 für ALI und beim ARDS 58,7 pro 100 000 Personen/Jahr in amerikanischen Untersuchungen [143]. Weitere Risikofaktoren tragen zu der Entstehung eines ARDS bei und lassen sich in direkte, wie Pneumonie, Lungenkontusion oder Inhalationstraumen und indirekte, wie Sepsis,

Trauma oder Pankreatitis einteilen [142]. Die Sepsis stellt den am häufigsten zu einem ARDS führenden Risikofaktor dar [143] und birgt ebenfalls das höchste Risiko, an einem ARDS zu versterben. Insgesamt kommen die USA auf annähernd 200 000 Sepsis-Fälle pro Jahr [26],[115]. In Folge des demographischen Wandels wird in den kommenden 25 Jahren eine Verdoppelung der Inzidenz prognostiziert [143]. Die ARDS-Diagnose korrelierte mit dem Gewebsschaden, wohingegen die Mortalität nach ARDS eher mit den Markern der systemischen Inflammation korrelierte [171]. Dies ist gerade vor dem Hintergrund einer Mortalität für ALI von 38,5% und für das ARDS bei 41,1% von großem Interesse für die klinische Forschung [143].

1.2. Definition und Epidemiologie der Sepsis

Das griechische Wort „*sepo*“, von dem sich der Terminus Sepsis ableitet, bedeutet Zersetzung eines Tiers, einer Pflanze oder anderem organischen Materials in der Gegenwart von Bakterien [59].

Auch im Zeitalter der modernen Medizin ist Sepsis die häufigste Todesursache bei Infektionen [131]. Das im Volksmund „Blutvergiftung“ genannte Krankheitsbild ist nach wie vor eine der Haupttodesursachen weltweit [131]. Insbesondere wenn spät diagnostiziert, können Schock und Multiorganversagen bis zum Tod führen[131], so dass 30-50% der Patienten an der Sepsis sterben [4],[44]. Gerade in den Entwicklungsländern ist Sepsis verantwortlich für 60-80% der jährlichen Todesfälle unter Kindern [91]. Die moderne Terminologie leitet sich aus den Ergebnissen der Consensus Konferenz von 1991 ab, die Sepsis als eine vermutete Infektion in Kombination mit zwei oder mehr Anomalitäten hinsichtlich der Körpertemperatur, der Herzrate oder der Anzahl der weißen Blutzellen definiert [21]. Deutschman und Tracey merken an, dass es sich bei der Sepsis nicht um einen stereotypischen, gleichmäßig voranschreitenden Prozess in Folge einer Infektion handelt [21]. Sepsis sei demnach auch keine definierte immunologische Erkrankung. Vielmehr erfordere ihr Verständnis eine Neuausrichtung des Forschungsfokus, um immunometabolische und neurophysiologische Mechanismen der zellulären- und Organdysfunktionen zu entschlüsseln [41].

Grundsätzlich tragen Patienten, die eine Sepsis überleben, in den folgenden fünf Jahren gegenüber anderen Krankenhauspatienten ein doppelt erhöhtes Risiko zu versterben[41]. Oft leiden ehemalige Sepsis-Patienten darüber hinaus unter körperlichen, kognitiven und psychischen Spätfolgen [3]. In Deutschland sind in den letzten 10 Jahren die mittleren Krankenhausbehandlungskosten bei Sepsis-Symptomatik im Bereich von ca. 55.000 € je

Patient gestiegen [14].

Sepsis geht einher mit sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Prozessen [30]. Hotchkiss und Kollegen unterscheiden drei potenzielle Entzündungsreaktionen während einer Sepsis [75]. Dabei sind die Hauptfaktoren für die Immunantwort die pathogene Virulenz, die Größe des bakteriellen Inokulums und das Vorhandensein von Begleiterkrankungen [75]. Im ersten Szenario wird die initiale Phase in zuvor gesunden Patienten mit schwerer Sepsis durch eine exzessive hyperinflammatorisch-proinflammatorische Antwort mit Fieber, Bluthochdruck und Schock gekennzeichnet [75]. In dieser frühen Phase versterben die Patienten durch Herz-Kreislauf-Kollaps, Stoffwechselstörungen und multiples Organversagen [75]. In einem zweiten Szenario, in welchem viele der septischen Patienten älter sind, wird ihr Immunsystem durch zahlreiche Nebenerkrankungen beeinträchtigt [75]. In diesen Fällen ist die Pathogenese durch eine abgeschwächte oder gänzlich ausbleibende hyperinflammatorische Reaktion mit einer prädominanten anti-inflammatorischen Phase gekennzeichnet [75]. Das dritte und letzte Szenario ist durch einen kreisförmigen Verlauf zwischen einem hyper- und hypoinflammatorischem Status charakterisiert. In diesem Fall erfahren die septischen Patienten initial eine hyperinflammatorische Reaktion, welcher sich eine hypoinflammatorische Reaktion anschließt [75]. Durch die Entwicklung einer zweiten, sich anschließenden Infektion erleben die Patienten wiederholt eine hyperinflammatorische Reaktion und erholen sich hiernach oder durchlaufen erneut eine hypoinflammatorische Phase [75]. In jeder der benannten Phasen besteht ein hohes Risiko zu versterben. In kritisch erkrankten Patienten ist die Organdysfunktion maßgeblich durch neutrophile Granulozyten getrieben [25], die mit der Freisetzung der pro-inflammatorischen Spaltprodukte des Komplementsystems, Anaphylatoxin und C5a, einhergeht [35],[116]. Die Hauptherausforderung im Rahmen der Sepsis-Therapie besteht für die Klinik darin, die simultane chronische Entzündung und die adaptive Immunsuppression zu kontrollieren und sekundäre nosokomiale Infektionen sowie einen schweren Protein-Katabolismus zu vermeiden [166].

Ein wichtiger Mechanismus für die Pathogenese der Sepsis scheint die für viele Organe nachgewiesene Apoptose von endothelialen, epithelialen und der immunologischen Abwehr dienenden Zellen zu sein [72]. Hotchkiss und Kollegen konnten durch retroorbitale Injektion von apoptotischen Splenozyten im Sepsis-Mausmodell mit einer Überlebensstudie eine signifikante Reduktion der Überlebensrate zeigen, wogegen die Injektion nekrotischer Zellen die Vitalität erhöhte [74]. Darüber hinaus konnten sie in einer anderen Studie zeigen,

dass der *adoptive transfer* apoptotischer oder nekrotischer Zellen *in vivo* die Apoptoserate der residenten Zellen (v.a. Lymphozyten) signifikant erhöhte, es also zu einem trans-destruktiven Effekt kam [151].

1.3. Trauma als Auslöser von Sepsis und akutem Lungenschaden

Weltweit ist das Trauma für Menschen unter 45 Jahren eine der Haupttodesursachen [68]. Dabei ist die Sterberate nach Trauma abhängig von der Zeit nach Auftreten der Verletzung [68]. So ist unmittelbar nach dem Trauma die Wahrscheinlichkeit am Unfallort oder innerhalb der ersten Stunde nach dem Unfall zu versterben bei 53-73% und im Wesentlichen auf massive Kopfverletzungen oder die massive Blutung zurückzuführen [20]. Eine weitere Erhöhung der Sterbewahrscheinlichkeit tritt innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma auf [147]. Dabei liegen die Ursachen hier vor allem in Hypoxie (Sauerstoffmangel), Hypovolämie (Blutmangel) oder traumatischen Kopfverletzungen. Im Falle des Überlebens der ersten 24 Stunden nach Trauma besteht ein erhöhtes Risiko eine Immundysfunktion mit nachfolgender Sepsis, die schließlich zum multiplen Organversagen führen kann, zu erleiden [147]. Alle schweren Komplikationen durch Trauma, wie das *Acute Respiratory Distress-Syndrom* (ARDS), das *Systemic Inflammatory Response-Syndrom* (SIRS) und das *Multiple Organ Dysfunction-Syndrom* (MODS) stehen in direkter Verbindung zur Bildung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren in den Blutkreislauf, was auch als sog. *first hit* bezeichnet wird [99]. Die sich anschließende chirurgische Intervention und/oder eine nachfolgende bakterielle Infektion werden als *second hit* bezeichnet [61],[99].

Die maßgeblichsten Gefahrenmoleküle für die Immunantwort im Anschluss an Traumaverletzungen sind doppelt funktionale Alarmine, wie *High-Mobility-Group-Protein-1* (HMGB-1), Interleukin 1 α (IL-1 α) und Interleukin 33 (IL-33) [166]. Sie spielen die wichtigste Rolle bei der Aktivierung und Ausbreitung der Entzündungsantwort nach Zerstörung der zellulären Integrität [166]. Neben diesen „klassischen“ Entzündungsfaktoren sind mitochondrielle *Danger Associated Molecular Patterns* (DAMPs), die Immunreaktionen nach Zerstörung von Zellen auslösen, verstärkt in den Fokus der Forschung gerückt [166]. Neben der Beobachtung, dass Mitochondrien entscheidende Mediatoren der Induktion des programmierten Zelltods, der Apoptose, während des traumatischen Schocks sind [79], gibt es nun auch Indizien für einen neuen Zelltodmechanismus, die sog. Nekroptose. Diese kann durch den Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) ebenso wie durch andere „Todes-Rezeptoren“ vermittelt werden [42],[175]. Der Schlüsselrezeptor für Gefahrenmoleküle ist *Toll like*

receptor-4 (TLR-4).

Schließlich gibt es viele Faktoren, die zur Immunreaktion und der Schädigung von Organen nach Trauma beitragen. Der einzige Faktor jedoch, der durch den behandelnden Mediziner adressiert werden kann, ist die sog. Interventionsrate [71]. Der Schaden, der durch die Immunantwort nach Trauma entsteht, kann mittels der gezielten Anwendung therapeutischer Maßnahmen und chirurgischer Behandlungsverfahren, verringert werden [71].

1.4. Das *double-hit*-Modell des thoraxtraumainduzierten polymikrobiellen akuten Lungenschadens

Die Arbeitsgruppe des *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI) hat bereits in ihrem Workshop *Future Research Directions in Acute Lung Injury* im Jahr 2002 darauf hingewiesen, dass die Erforschung der offenen Fragen zu ALI/ARDS in der Zukunft eine kontinuierliche Arbeit in der Grundlagen-, Translationalen und Klinischen Forschung erforderlich machen würde [107]. Im Hinblick auf Tier-Modelle wurde darauf hingewiesen, dass *double-hit* Modelle besser dazu in der Lage wären den Einfluss begleitender Erkrankungen und anderer bereits vorhandener Variablen herauszuarbeiten als *single-hit* Modelle [107]. Dies sei wesentlich zielführender um das Immunsystem und insbesondere die Entwicklung der akuten Lungenschädigung zu untersuchen [107].

Die Komplexität der Interaktionen der verschiedenen Gewebe und Zellpopulationen während Thoraxtrauma und Sepsis kann bisher nur unzureichend in Zell- und Tiermodellen wiedergegeben werden [136]. Viele der bisher beschriebenen Modelle beschränken sich auf die Untersuchung von direkten oder indirekten Modellen von ALI und werden so der Dynamik klinisch relevanter trauma-induzierter septischer Lungenschäden nur bedingt gerecht. Sepsis allein erwies sich nach CLP (*Cecal Ligation and Puncture*)-Induktion im Rattenmodell [38] und in der Maus [127] als nicht ausreichend zur Induktion einer typischen akuten Lungenschädigung. Die Kombination klinisch relevanter Modelle zu einem sogenannten *double-hit* (DH) kann dazu beitragen, die Dynamik der Lungenschädigung im Menschen besser zu verstehen [107],[136].

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden am von Perl et al. 2012 beschriebenen Modell der Thoraxtrauma induzierten septischen akuten Lungenschädigung durchgeführt [127]. Dieses ist von besonderer klinischer Relevanz, da über 50% der mehrfach verletzten Patienten mit einem hohen Verletzungsgrad von einem Thoraxtrauma betroffen sind [23]. Dabei entwickeln bis zu 80% dieser Patienten während einer andauernden mechanischen

Beatmung Organversagen mit respiratorischen Komplikationen, allen voran Akute Lungenentzündungen [113],[123].

Durch den septischen Schaden als *second hit* wird ein Stimulus gesetzt, der den Krankheitsverlauf der Patienten zur schweren Lungenschädigung (ARDS) verschärft. Sepsis stellt dabei einen der größten Risikofaktoren hinsichtlich der Sterblichkeitsrate durch ARDS von bis zu 50% dar [26],[176].

1.5. Der Pathomechanismus von Akutem Lungenschaden und Sepsis

1.5.1. Die Epithelzellhypothese

Im Jahr 1982 beschrieben Bachhofen et al. strukturelle zelluläre Veränderungen im Lungengewebe von Patienten mit akuter Lungenschädigung [9]. Die Analyse ergab, dass es sich dabei um apoptotische Typ-II Epithelzellen handelte [9]. Diese Entdeckung war wegbereitend für die pathomechanistischen Überlegungen der sog. Epithelzellhypothese [9]. Alveolare Typ-I Epithelzellen bilden als wichtiger Bestandteil der alveolokapillären Barriere 90% der alveolaren Auskleidung der Lunge [2]. Ihre Regeneration erfolgt aus Typ-II Epithelzellen, die zu 10% Bestandteil des Alveolarepithels sind [2]. Diese Zellen zeichnen sich durch ihre hohe Regenerationsfähigkeit und die Produktion von *Surfactant* aus und sind so für die Gewährleistung der zellulären Integrität und die physiologische Funktion der Lunge essentiell [180]. Liener et al. konnten im Rattenmodell zeigen, dass ein stumpfes Thoraxtrauma allein ausreicht, Apoptose in Typ-II Epithelzellen zu induzieren [100]. In weiteren Untersuchungen wurde die Rolle von Mediatoren aktivierter Alveolarmakrophagen bei der Aktivierung des inflammatorischen wie auch des extrinsischen apoptotischen Signalweges, vermittelt durch den Fas-Rezeptor (CD95), nachgewiesen [156]. Dass in Mäusen, die defizient für Makrophagen waren, in Folge der Instillation eines Fas-Liganden (Jo2) ebenfalls Fas-vermittelte Entzündungsreaktionen beobachtet wurden, legt den Schluss nahe, dass weitere Faktoren an der Entzündungsantwort und der Apoptose in der Lunge beteiligt sind [27],[103],[124]. In einem *double-hit* Modell aus CLP-induzierter Sepsis und hämorrhagischem Schock an Fas oder FasL-defizienten Mäuse konnten verminderte Spiegel an lokalen apoptotische und inflammatorischen Mediatoren nachgewiesen werden [124]. Auch in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von ARDS Patienten sind erhöhte Wert von FasL beobachtet worden. *Ex vivo* zeigte sich, dass diese BALF Apoptose in (*postmortem* isolierten) humanen alveolaren Epithelzellen induzieren konnte [108]. Offenbar werden die beobachteten Effekte durch den Transkriptionsfaktor NFκB vermittelt

und können durch verschiedene Liganden, wie Fas und TNF α induziert werden [65]. Der Erhalt der Integrität der alveokapillären Barriere im Rahmen direkter oder indirekter Lungenschädigung scheint damit ein möglicher Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen. Verschiedene Studien, wie die Reduktion der Epithelzellapoptose nach LPS (Lipopolysaccharid)-Instillation durch den Pan-Caspase Inhibitor zVAD-fmk [87], oder die Verwendung von siRNA gegen verschiedene Faktoren des apoptotischen Signalweges einhergehend mit einer verbesserten Integrität des Lungengewebes, machen die Bedeutung des programmierten Zelltods im Rahmen der Lungenschädigung nachhaltig deutlich [27],[111].

1.5.2. Die Neutrophilenhypothese

Neben den Epithelzellen sind auch die polymorph nukleären neutrophilen Granulozyten (PMN) bei der Pathogenese der akuten Lungenschädigung von maßgeblicher Bedeutung und bilden die Basis für die sog. Neutrophilenhypothese [70]. Dies scheint zunächst einmal paradox, sind es doch PMN deren primäre Funktion darin besteht, Gefahrenmoleküle und Pathogene unschädlich zu machen und durch die Ausschüttung einer Vielzahl von Mediatoren die Heilung der Lunge zu fördern [167]. Das Gefährdungspotenzial der PMN scheint jedoch dann zu Tage zu treten, wenn die Balance aus Rekrutierung und Aktivierung nicht mehr gegeben ist [62],[167]. Unter physiologischen Bedingungen besitzen PMN *in vivo* eine dynamische Lebensdauer von 7-12 Stunden [53]. Die Lunge ist vor allem mit reifen, terminal differenzierten Neutrophilen angereichert [161]. Durch eine Vielzahl inflammatorischer Reize können periphere PMN jedoch aktiviert, ihre chemotaktische Reaktion verstärkt und ihre Lebensdauer deutlich verlängert werden [161]. Dadurch wird die Rekrutierung der Neutrophilen Granulozyten zum Ort der Schädigung, wie der Lunge, erleichtert [97],[169]. Wichtige Effektoren der PMN Rekrutierung sind die Chemokine *keratinocyte-derived chemokine* (KC), *Macrophage Inflammatory Protein-2* (MIP-2) in der Maus, bzw. deren humanes Analog Interleukin 8 (IL-8), sowie das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) [76]. Die verlängerte Lebensdauer der PMN wird offenbar durch TNF α über NF κ B und die Induktion der Expression anti-apoptotischer Signalmoleküle hervorgerufen [90]. Die vollständige Aktivierung der Neutrophilen erfolgt offenbar durch einen zweistufigen Prozess [165]. Dieser wird als *Priming* bezeichnet und durch proinflammatorische Zytokine, wie TNF α und IL-1 β , oder durch Kontakt mit aktivierten Endothelzellen und anschließender Präsentation von sog. Pathogen assoziierten molekularen Mustern (PAMPs), Chemoattraktantien oder Wachstumsfaktoren initiiert [165]. Das *Priming*

ist für die maximale Degranulation der Neutrophilen und die Aktivierung des NADPH-Oxidase-Signalwegs erforderlich [64],[165]. In Bezug auf die Aktivierung und Chemotaxis der Neutrophilen spielen ELR-CXC Chemokine (CXC Chemokine enthalten ein Glutamat-Leucin-Arginin Motiv (ELR) unmittelbar vor dem Amino-terminalen Cystein-X-Cystein Motiv (CXC)) eine entscheidende Rolle [146]. Beispiele hierfür sind das humane IL-8 (CXCL8) und dessen murines Analog KC (CXCL1) sowie MIP2 α (CXCL2) [137],[184]. Diese Chemokine wirken über den Rezeptor CXCR2 und aktivieren so Neutrophile und fördern deren Adhäsion an des Endothelium [137],[184].

Der schädigende Effekt aktivierter neutrophiler Granulozyten konnte durch allogenen Transfer (Injektion in die Schwanzvene) von hämorrhagischen Tieren auf Tiere gezeigt werden, deren Neutrophile durch einen PMN-Antikörper depletiert waren [8]. So führten die Neutrophilen nach *Priming* in diesen Tieren nach Sepsis-Induktion zur Ausbildung einer akuten Lungenschädigung [8]. Durch Depletion neutrophiler Granulozyten in verschiedenen Modellen der akuten Lungenschädigung konnte demgegenüber eine deutliche Reduktion der inflammatorischen Antwort und/oder der Lungenschädigung beobachtet werden [103],[128],[129]. Bereits 1986 zeigten Laufe et al., dass auch neutropenische Patienten einen akuten Lungenschaden ausbildeten [96]. Neutrophile können ihre Kernbestandteile abbauen und als sog. Neutrophile Extrazelluläre Fallen (NETs-*Nuclear Extracellular Traps*) freisetzen [93],[185]. Die Beteiligung von NETs im Rahmen pulmonaler Erkrankungen konnte für die Transfusions-assoziierte akute Lungenentzündung (TRALI) nachgewiesen werden [29].

1.6. Die Rolle der apoptotischen Zellen und ihrer Phagozytose in der pulmonalen Immunmodulation

Generell kann eine kaum mehr überschaubare Zahl von zellulären Todesarten unterschieden werden. Prinzipiell ist jedoch eine Kategorisierung nach Beteiligung oder Fehlen von Caspasen sinnvoll.

Nekrotische Zellen können in primär nekrotisch (induziert durch physikalische oder chemische Einflüsse), sekundär nekrotisch (durch verzögerte Phagozytose apoptotischer Zellen), nekroptotisch (durch Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR1) vermittelte Aktivierung von Rezeptor-Inhibierenden Protein Kinasen 1 und 3 (RIP1/RIP3)) und pyroptotisch (durch mikrobielle Infektionen), klassifiziert werden [17],[135],[175]. Schließlich sind Neutrophile und Eosinophile Granulozyten in der Lage einen programmierten Zelltod durch Freisetzung extrazellulärer Fallen (NETs) als Reaktion auf

Pathogene und sterile Entzündungsmediatoren mit potenziell antimikrobiellen aber pro-inflammatorischen Folgen zu durchlaufen [170]. Nekrotische Zellen sind primär durch einen Verlust der zellulären Integrität einhergehend mit Auflösung der Zellmembran gekennzeichnet [170]. Dadurch gelangen vormals intrazellulär kompartimentierte Gefahrenmoleküle, sog. *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) in den extrazellulären Raum und werden von verschiedenen Rezeptoren intakter Zellen, wie z.B. Toll-like Rezeptoren (TLRs) den *receptor for advanced glycation end-products* (RAGE) oder den *receptor suppression of tumorigenicity* (ST2) erkannt [22],[94]. Dieser Prozess ist in der Regel pro-inflammatorisch und gekoppelt an die im Nachfolgenden beschriebenen Prozesse der Phagozytose.

„Apoptose“ bezeichnet den Caspase- und energieabhängigen programmierten und kontrollierten Zelltod. Generell erfolgt die Entfernung apoptotischer Zellen über Ingestion durch professionelle Phagozyten, wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen [69]. Es hat sich darüber hinaus gezeigt, dass auch benachbarte Zellen, nicht-professionelle Phagozyten, wie Epithelzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten in der Lage sind apoptotische Zellen aufzunehmen [135]. Prinzipiell sind bestimmte Rezeptoren auf der Oberfläche der phagozytierenden Zellen notwendig, um eine Aufnahme apoptotischer Zellen zu ermöglichen [135]. Die Aufnahme von apoptotischem Zellmaterial wird als dreistufiges Konzept der Interaktion zwischen Phagozyten und apoptotischen Zellen beschrieben [50]. Zunächst geben apoptotische Zellen in der Frühphase des programmierten Zelltods sog. *find-me*-Signale ab [43],[174]. Dabei handelt es sich um chemotaktisch aktive Signale, vermittelt durch Nukleotide, Lysophosphatidylcholin (LPC) oder auf Mikropartikeln gebundenes Intrazelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-3 [43],[132],[174]. Nach der Rekrutierung erfolgt die Bindung der apoptotischen Zellen, nach dem sog. *Tethering und Tickling*-Modell, z.B. vermittelt durch CD14 und CD47 [164]. Die apoptotischen Zellen sind durch eine Umlagerung von Phosphatidylserin von der Zellinnen- auf die Außenseite gekennzeichnet. Diese ist eine wichtige Voraussetzung für den erfolgreichen Ablauf der Phagozytose und stellt selbst ein „*eat-me*“-Signal dar [51]. Letzteres wird über verschiedene Adaptermoleküle durch Rezeptoren auf der Oberfläche des Phagozyten, wie z.B. den Phosphatidylserin-Rezeptor, die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Mer oder den Vitronectin-Rezeptor, erkannt [50],[66],[152]. Neben Phosphatidylserin wird auch Calreticulin (CRT) auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen exponiert und auf dem Phagozyten durch CD91 erkannt [57]. Bemerkenswerterweise scheint Apoptose vermittelt durch CRT zu einer immunogenen Reaktion gegen die apoptotischen Antigene zu führen

[58],[95],[120]. Schließlich erfolgten die Ausbildung einer sog. *Engulfment*-Synapse und die Inkorporation der apoptotischen Zelle. Um die Phagozytose zu erleichtern, ist der Prozess der Apoptose durch die Ausbildung sog. Apoptotischer Körperchen gekennzeichnet [66]. In den meisten Zelltypen erfolgt die Ausbildung dieser Plasmamembran-Bläschen durch die Caspase-3-vermittelte Aktivierung der Rho-assoziierten Kinase 1 (ROCK 1) [66],[119]. Diese führt daraufhin zur Phosphorylierung der leichten Myosin-Kette und fördert so die Aktomyosin-Kontraktion zur Ausbildung der Membran-Bläschen und der Apoptotischen Körperchen [34],[119],[153].

Apoptotische Zellen induzieren die Freisetzung einer Vielzahl an immunologisch aktiven Mediatoren [119]. Diese können sich aus der Qualität der apoptotischen Zellen (z.B. der individuellen Ausstattung mit „eat-me“-Signalen), welche eine Auskunft über den Zelltyp, die Ursache des Zelltodes und den Aktivierungsstatus der sterbenden Zellen geben, ableiten [119]. Des Weiteren kann die Anzahl der apoptotischen Zellen die lokale Phagozytosekapazität übersteigen und so sekundäre Nekrose mit pro-immunogenen Reaktionen induzieren [133]. Schließlich kann das Timing des Zelltods und die Dauer der zellulären Signale auf die immunologischen Konsequenzen einwirken [119],[135].

1.7. Apoptotische Zellen und akuter Lungenschaden

Während der akuten Lungenschädigung durch ALI/ARDS kommt es zur Apoptose von Epithelzellen in der Lunge [117],[125],[130]. Das Vorhandensein der apoptotischen Zellen, aber auch davon unabhängige Entzündungsfaktoren, führen zu einer massiven Rekrutierung von aktivierten Neutrophilen in die Lunge, die z.T., nach einer gewissen Latenzphase, ebenfalls apoptotisch werden [130]. Das apoptotische Zellmaterial wird primär von Alveolarmakrophagen eliminiert, wenngleich auch Epithel- und Endothelzellen zur Phagozytose fähig sind. Nach Instillation apoptotischer Zellen in die Lunge wurden diese von den residenten Alveolarmakrophagen zu über 85% innerhalb von 24 Stunden aufgenommen. Bei nicht-apoptotischen Zellen war hingegen kaum eine Aufnahme nachweisbar [74]. Generell werden der Phagozytose apoptotischer Zellen überwiegend anti-inflammatorische Effekte zugeschrieben [48],[135].

Verschiedene Studien der letzten Jahre weisen darauf hin, dass auch andere Zelltodmechanismen an Sepsis, Trauma oder anderen Krankheitsbildern beteiligt sind. Insbesondere im Rahmen der Sepsis scheint der Prozess der Nekroptose von Bedeutung zu sein. So zeigte sich im Modell des TNF α -induzierten SIRS durch Necrostatin-1, sowie bei CLP-induzierter Sepsis bei systemischer Deletion von *Receptor-interacting*

serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK3) und der damit (in beiden Fällen) einhergehenden Inhibition des nekroptotischen Signalweges eine protektive Wirkung auf die Lunge sowie andere Organe [42]. Es konnte dabei ebenfalls beobachtet werden, dass die Signal-Mechanismen, die für Apoptose und Nekroptose eine Schnittmenge aufweisen, auch im Rahmen der Autophagie von Bedeutung sind [84]. Nähere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Prozesse der zellulären Degeneration und des Zelltods ebenfalls mit Autophagie in Zusammenhang stehen [56],[102],[144]. Zuletzt wurde es zunehmend möglich, das pathologische Potenzial der Autophagie in Tiermodellen der Sepsis und der akuten Lungenschädigung aufzuzeigen [57],[77],[98],[168].

Insgesamt haben eine Reihe von Untersuchungen gezeigt, dass Autophagie und Apoptose getrennt, zeitgleich oder einander entgegengesetzt, jeweils abhängig vom experimentellen Kontext, auftreten können [145]. Die genaue Charakterisierung des jeweiligen Vorkommens beider Prozesse bedarf demnach der dezidierten Analyse im entsprechenden Fall [145].

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der hohen Inzidenz des Thoraxtraumas, nach Angaben des Traumaregisters der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, von bis zu 59,2% bei Schwerverletzten sowie einer nach wie vor hohen Mortalitätsrate von 15-20%, ist die Kombination von Thoraxtrauma und Sepsis von besonderer klinischer Bedeutung [83],[86].

Die pathomechanistischen Konsequenzen, ausgelöst durch die Präsenz apoptotischer Epithelzellen in der Lunge und deren Phagozytose, sind nur unzureichend, ihre Relevanz in der Pathogenese des traumainduzierten septischen ALI überhaupt nicht erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung apoptotischen und nekrotischen Zellmaterials auf die gesunde Lunge des verwendeten Modellorganismus, der männlichen C57/BL6 Maus, hinsichtlich Inflammation, sekundärer Apoptose der ortsständigen Lungenparenchymzellen, Rekrutierung von PMN aus dem Blut und Induktion einer alveolokapillären Schrankenstörung untersucht. Im Besonderen lag der Fokus der Untersuchung auf der Frage, ob durch eine gezielte Steigerung der Anzahl apoptotischer oder nekrotischer Zellen in der Lunge eine Inflammation sowie ein Lungenschaden induziert werden kann. Schließlich wurde die pathophysiologische Relevanz dieser Mechanismen im kliniknahen Tiermodell des traumainduzierten septischen ALI untersucht. Die hierbei relevante Fragestellung war, ob durch gezielte Applikation einer geringen Anzahl apoptotischer oder nekrotischer Zellen während der Entstehung des ALI, durch eine möglicherweise damit einhergehende negative Triggerung des pulmonalen phagozytären

Systems, eine Abschwächung des Schweregrades der Lungenschädigung hervorgerufen werden kann. Demgegenüber wurde untersucht, ob eine große zusätzliche Anzahl apoptotischer oder nekrotischer Zellen den Schweregrad des ALI auch negativ beeinflusst. Die bearbeiteten Hypothesen lauten mithin:

1. *Die Präsenz einer großen Menge von apoptotischen Epithelzellen in der gesunden Lunge induziert eine pulmonale Entzündungsreaktion mit sekundärer Lungenschädigung.*
2. *Syngenes Gewebe (Lungenhomogenat) und eine hohe Zahl nekrotischen Zellmaterials führt, intrapulmonal deponiert, in gesunden Tieren zur Induktion einer pulmonalen Entzündungsreaktion.*
3. *Durch die gezielte Applikation syngenen Gewebes (Lungenhomogenat) nach Trauma wird der Schweregrad des septischen ALI früh nach intrapulmonaler Applikation erhöht.*
4. *Durch die gezielte Applikation einer hohen Anzahl apoptotischer/nekrotischer Epithelzellen oder syngenen nekrotischen Materials (Lungenhomogenat) nach Trauma wird der Schweregrad des septischen ALI mittelbar nach intrapulmonaler Applikation erhöht.*
5. *Durch die gezielte Applikation einer kleinen Menge apoptotischer/nekrotischer Epithelzellen kann der Schweregrad des septischen ALI vermindert, durch die gezielte Applikation einer hohen Menge apoptotischer Epithelzellen dagegen, kann der Schweregrad des septischen ALI erhöht werden.*

2. Material und Methoden

2.1. Puffer, Lösungen und Medien

- 4% Formalin: 4 ml 37%iges Formalin + 33 ml PBS
- 10% Formalin 10ml 37%iges Formalin + 23ml PBS
- 10x-PBS: 9,01 mM CaCl₂; 4,93 mM MgCl₂•6H₂O; 26,67 mM KCl; 14,71 mM KH₂PO₄; 1379,31 mM NaCl; 80,6 mM Na₂HPO₄•7H₂O in *Aqua dest.*
- DMEM + 10% FCS: 500 ml DMEM; 500 µl Gentamicin; 5 ml Penicillin-Streptomycin; 55 ml hitzeinaktiviertes FCS
- ELISA-Waschpuffer: 0,05% Tween 20 in PBS
- FACS-Puffer: 1% BSA in PBS
- KH₂PO₄-Puffer: 11,26 g KH₂PO₄ ad. 1 l *Aqua dest.* + 0,5% Hexadecyltriethylammoniumbromid; eingestellt auf pH 5,4
- PBS: 2,67 mM KCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 137,93 mM NaCl; 8,06 mM Na₂HPO₄•7H₂O in *Aqua dest.*
- RPMI + 10% FCS: 500 ml RPMI 1640; 500 µl Gentamicin; 5 ml Penicillin-Streptomycin; 55 ml hitzeinaktiviertes FCS

2.2. Kommerziell erhältliche Kits

- APO-BrdUTM TUNEL Assay Kit Becton Dickinson & Co, Fr. Lakes, USA
- AnnexinV-FITC/7-AAD Kit Beckman Coulter, Brea, USA
- BCA Protein Assay Kit Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
- Caspase-Glo[®] 3/7 Assay Promega, Madison, USA
- ChemiGlow[®] Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
- DuoSet[®] ELISA Kit R&D, Systems, Minneapolis, USA
- BD OptEIATM ELISA Set Becton Dickinson & Co, Fr. Lakes, USA
- Hemacolor-Schnellfärbeset Merck, Darmstadt

- *In situ* Cell Death Detection Kit Roche Diagnostics, Mannheim
- Vectastain® ABC Kit Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.3. Analytische/präparative Geräte

- Ausgießstation Microm EC -350-1 Microm, Walldorf
- Axio Imager M1 Mikroskop Zeiss, Oberkochen
- CytoFluor Fluoreszenz-Reader Perseptive Biosystems, Framingham, USA
- Einbettautomat Leica Asp200 Leica Microsystems, Wetzlar
- Entwickler Eastman Kodak Co., Rochester, USA
- FACS Canto II Becton Dickinson, Heidelberg
- Inkubator HERACELL 150i Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
- Luminoskan Ascent Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
- Microplate Reader Tecan, Crailsheim
- Microtom HM450 Microm, Walldorf
- Narkosemischeinheit Vapor Drägerwerk AG, Lübeck
- Radiometer VLX-3W + CX254 Vilber Lourmat, Marne-La-Valée, FRA
- Schüttelwasserbad SW23 Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
- Shandon Cytospin 3 Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
- Stromregler PowerPac™ HC Bio-Rad Inc., Hercules, USA
- Tecan Sunrise Reader Tecan, Crailsheim
- Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell Bio-Rad Inc., Hercules, USA
- Ultraschallgenerator Sonopuls HD2070 Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin
- Ultra Turrax T 25 IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
- Vortex-Genie® 2 Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Wellwash 4 MK 2 Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

2.4. Verwendete Software

- Axio Vision Version 4.4 Zeiss, Oberkochen
- BD FACSDiva™ Software (Vs 6.1.2) Becton Dickinson, Heidelberg
- SigmaStat Version 3.5 SPSS Science Software GmbH, Erkrath
- SigmaPlot Version 11.0 SPSS Science Software GmbH, Erkrath
- XFluor4 Tecan, Crailsheim

2.5. Zelllinien und Kulturmedien

Für die Zellversuchsreihen wurden immortalisierte Maus-Lungen-Epithelzellen (MLE12 Zelllinie, ATCC CRL-2110) verwendet (LGC Ltd., Middlesex, UK). Die Kultivierung der MLE12-Zellen erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12, Invitrogen, Carlsbad, USA) mit Zusatz von 2% FCS (GE Healthcare, South Logan, USA), 10 mM HEPES, 30 nm Natriumselenit, 10 nm Hydrocortison, 10 nm β -Estradiol, 0,01 mg/ml Apotransferrin (Invitrogen, Carlsbad, USA) und 0,005 mg/ml Insulin. Soweit nicht anders angegeben, sind die Medien mit einem Gemisch aus 100 I.U. Penicillin und 100 μ g Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, USA) pro ml versetzt worden. Für sämtliche Zellversuche, sofern nicht anders angegeben, bestanden Kulturbedingungen von 37°C in 5%-iger CO₂-Atmosphäre (Inkubator Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Die Lösung adhärenter Zellen aus den Zellkulturflaschen (80 cm², Filter Cap, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) erfolgte mit 2,5 ml 0,5%-igem Trypsin-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, USA).

2.5.1. Nekrose-Induktion an Maus-Lungen-Epithelzellen

Zur Herstellung nekrotischer Zellen bzw. nekrotischen Zellmaterials wurden die Zellen physikalisch aufgebrochen. Dafür wurden die Zellen (zu 1×10^7 Zellen) in 100 μ l DPBS (Invitrogen AG, Carlsbad, USA) resuspendiert und anschließend in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden die Zellen für 5 sec in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nun wurden die Zellen so lange bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Suspension sich wieder vollständig verflüssigt hatte. War dieser Zustand erreicht, schlossen sich, in zuvor beschriebener Weise, zwei weitere Gefrier-/ Auftau-Zyklen an. Durch diese konsekutive Abfolge konnte nahezu in allen behandelten Zellen Nekrose „induziert“ werden. Die Quantifikation der Nekrose erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse nach

AnnexinV/ 7-Aminoactinomycin (7-AAD) -Färbung, wie nachfolgend beschrieben.

2.5.2. Quantifikation der Apoptose/Nekrose durch fluoreszenzaktivierte Zell-Sortierungs-Analyse

2.5.2.1. AnnexinV und 7-Aminoactinomycin D Färbung

Um den Grad der Apoptose, bzw. den entsprechenden Vitalitätsstatus der Zellen, zu ermitteln, wurden die MLE12-Zellen im Anschluss an die jeweilige UV-Exposition drei Mal in PBS gewaschen (5 min, 450 x g, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet schließlich mit *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Puffer versetzt (siehe Herstellerangaben; Beckman Coulter, Brea, USA). Nach Zugabe von AnnexinV (10 µl) und 7-AAD (20 µl), wurden die Zellen für 15 min bei 4°C inkubiert. Die anschließende FACS-Messung machte sich den Umstand zu Nutze, dass AnnexinV an Phosphatidylserin bindet. Das zugrundeliegende Prinzip ist, dass sterbende (hier apoptotische) Zellen Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche exponieren, welches dadurch als Bindungspartner für AnnexinV fungieren kann. Demgegenüber handelt es sich bei 7-AAD um einen DNA-interkalierenden Avitalfarbstoff. Dabei wird ausgenutzt, dass es als Farbstoff in die DNA (vor allem) nekrotischer Zellen interkaliert und die DNA so anfärbt. Gebundenes AnnexinV konnte durch Anregung im *Fluorescein isothiocyanate* (FITC)-Kanal und gebundenes 7-AAD im Phycoerythrin (PE)-Kanal des BD FACS CantoII (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) sichtbar gemacht und gemessen werden.

Das resultierende Profil wurde in folgender Weise interpretiert: Zeigten sich die Zellen FITC-positiv, so wurden diese Zellen als apoptotisch bezeichnet. Genauer würde man hier von dem Stadium der frühen Apoptose sprechen, da die Zellmembran hier noch intakt war. Wiesen die Zellen sowohl Signale im FITC- als auch im PE-Kanal auf, so handelte es sich hier um sekundär nekrotische Zellen, bei denen die Integrität der Zellmembran zerstört und die DNA so zugänglich geworden war.

2.5.2.2. *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*

Als weitere Nachweismethode der zellulären Vitalität wurde das *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling* –Verfahren (TUNEL) unter Verwendung des APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit (Becton Dickinson & Co, Fr. Lakes, USA) gewählt. Hierzu wurden die Zellen zunächst in 1% Paraformaldehyd in PBS bei einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml suspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 1 h. Nun wurden die Zellen pelletiert und

der Überstand verworfen (5 min, 300 x g). Es folgten zwei Waschschriffe in PBS (5 min, 300 x g) und die abschließende Resuspendierung in 70% eiskaltem Ethanol. Im Anschluss an eine weitere Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Als nächstes wurden die Zellen zweimal in Wasch-Puffer resuspendiert, pelletiert und dann mit DNA Labeling Solution (nach Herstellerangaben) versetzt. Einer einstündigen Inkubation bei 37°C (mit gelegentlichem Schwenken) folgte die Zugabe von 1 ml *Rinse Buffer* mit konsekutiver Zentrifugation (5 min, 300 x g). Der letzte Wasch-Schritt wurde wiederholt und die Zellen anschließend in 0,1 ml Antibody Staining Solution unter Lichtabschluss für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden 0,5 ml PI/RNase *Staining Buffer* (nach Herstellerangabe) zugegeben und die Zellen erneut wie hiervor beschrieben inkubiert. Die Messung erfolgte letztlich am BD FACS CantoII bei 623 nm (PI) und 520 nm (FITC) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

2.5.3. Apoptose-Quantifikation durch Chemilumineszenz

Als drittes Verfahren zur Analyse des Vitalitätsstatus der Zellen kam das Chemilumineszenz-Verfahren des Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega Corporation, Madison, USA) zur Anwendung. Hierzu wurden die Zellen zunächst pelletiert (300 x g, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen, und die Zellen anschließend in 50 µl Caspase-3/7 Chemilumineszenz-Substrat (nach Herstellerangabe) resuspendiert. Nun wurde diese Zellsuspension auf 96 Well Platten (96F Nunclon™ Δ Surface, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) ausgebracht. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte 5-minütlich über den Zeitraum einer Stunde mit dem Luminoskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA), wobei die Platten zwischen den Messzeitpunkten lichtgeschützt bei 37°C inkubiert wurden.

Durch die Zugabe des Chemolumineszenz-Substrats wurden die Zellen lysiert und so die intrazellulären Bestandteile freigesetzt. Die Enzyme der Zellen waren auf diesem Weg für ein Substrat zugänglich, welches durch die Anwesenheit und die katalytische Aktivität der Caspasen-3/7, durch Spezifität für die DEVD Aminosäuresequenz, umgesetzt wurde. Da diese Umsetzung von einer Farbreaktion (UltraGlo™ Luciferase) begleitet war, konnte die enzymatische Aktivität der Caspasen-3/7 semiquantitativ luminometrisch analysiert werden.

2.5.4. Vorversuche zur Apoptose-Induktion an Maus-Lungen-Epithelzellen

Zur Induktion der Apoptose an MLE12-Zellen wurden zunächst drei verschiedene Ansätze verfolgt. So erfolgte eine UV-C-Bestrahlung der Zellen, die Koinkubation mit H₂O₂ und in einem dritten Ansatz eine γ-Bestrahlung. Die Bestrahlung durch UV-C wurde in Petrischalen

vorgenommen. Da der Deckel UV-absorbierende Eigenschaften besaß, wurde für alle UV-Experimente der Deckel der Petrischale, für die Dauer der Bestrahlung, entfernt. Die Koinkubation der MLE12-Zellen mit H₂O₂ erfolgte in einer 24 Well Kulturplatte (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Zur γ -Bestrahlung wurden die Zellen in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt. Da durch die Koinkubation mit H₂O₂ sowie die γ -Bestrahlung keine ausreichend hohe und reproduzierbare Apoptose induziert werden konnte, soll im Folgenden nur auf das Verfahren der UV-C Bestrahlung näher eingegangen werden.

2.5.5. UV-C Bestrahlung der Maus-Lungen-Epithelzellen

Ziel dieser Versuchsreihen war es, eine Methode der Apoptose-Induktion zu entwickeln, die es ermöglichen würde, für eine maximale Anzahl an MLE12-Zellen zu einem reproduzierbaren Zeitpunkt den programmierten Zelltod (Apoptose) zu induzieren. Dabei wurde insbesondere die Methode der UV-C Bestrahlung in den Vordergrund gestellt, da es sich hierbei um ein kontaktloses Verfahren handelt. Darüber hinaus kamen bei diesem Verfahren keine chemischen Substanzen zur Anwendung, die im späteren Verlauf (insbesondere für die *in vivo* Versuchsreihen) mit Nebeneffekten behaftet gewesen wären. Eine optimale Rate apoptotischer Zellen konnte durch die Verwendung des nachfolgenden Protokolls erreicht werden:

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt.

1. Die MLE12-Zellen wurden nach 2-3 Passagen in der Zellkulturflasche auf Petrischalen (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) passagiert und zunächst bis zu einer bestimmten Zelldichte (ca. 70% Konfluenz) in Vollmedium (DMEM/F12; 2% FCS; + Additive (siehe 3.1.) kultiviert.
2. Anschließend wurde das Vollmedium für 12 h durch Hungermedium (DMEM/F12; 1% FCS; + Additive) ersetzt.
3. Zur Apoptose-Induktion wurde das Medium abgenommen und durch ein definiertes Volumen (hier bei Petrischalen mit \varnothing 12,5 cm, 3 ml) Hungermedium (DMEM/F12; 1% FCS; + Additive, ohne Phenolrot) ersetzt.
4. Die Oberfläche der Petrischale wurde nun (ohne Deckel) für 60 sec UV-C exponiert.

5. Anschließend wurde ein definiertes Volumen an Hungermedium (siehe 3.) von 6 ml zugegeben.
6. Die UV-C exponierten Zellen wurden abschließend für 6 h bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert (mit Deckel).
7. Zuletzt wurden diejenigen Zellen abpipettiert, welche ihre Adhärenz verloren hatten und sich daher im Überstand befanden.

Hierbei galt es zu beachten, dass die UV-C Quelle bereits fünf Minuten zuvor aktiviert wurde, damit sich die stabile Strahlendosis einstellen konnte (Vergleich hierzu Messung der Strahlendosis im Anhang). Zur Ermittlung der optimalen Strahlendosis wurden verschiedene Konditionen untersucht. Diese schlossen die verwendeten Mengen an Medium, die verwendete Zelldichte aber auch die Exposition unter verschiedenen Strahlendosen mit ein. Der Effekt der jeweiligen Konditionen in Bezug auf das Potenzial verschiedene Zelltodmechanismen zu induzieren, wurde durch das AnnexinV-FITC/7-AAD Kit (Beckman Coulter, Brea, USA), das APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit (Becton Dickinson & Co, Fr. Lakes, USA) sowie den Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega Corporation, Madison, USA, siehe auch 3.2.3.4) evaluiert (mehr hierzu unter 3.1.3 a und b sowie 3.1.4.). Zusätzlich wurden Zytospin-Präparate angefertigt (3 min, 800 x g; Shandon Cytospin 3; Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) und anschließend ein Hemacolor®-Schnellfärbetest (Merck KGaA, Darmstadt) durchgeführt (genauer unter 3.4). Zur qualitativen Auswertung der Färbung erfolgte eine lichtmikroskopische Untersuchung (Axio Imager M1 Mikroskop; Zeiss, Oberkochen).

2.5.6. Vitalfärbung von Maus-Lungen-Epithelzellen

Um den Erfolg der Instillationsverfahren in den nachstehenden Tierversuchen zu gewährleisten, wurden Zellen *in vitro* markiert und anschließend *in vivo* detektiert. Hierzu erfolgte die Färbung der MLE12-Zellen mithilfe des grün fluoreszierenden Vitalfarbstoffs 5-Chloromethyl-fluorescein Diazetat (CMFDA, Invitrogen, Carlsbad, USA): zunächst wurde das Vollmedium der MLE12-Zellen abgenommen und durch vorgewärmtes, FCS freies Vollmedium (DMEM/F12 + Additive), versetzt mit 25 µM CMFDA (37°C), ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 45 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Es folgte die Abnahme des Mediums und die Trypsinierung der Zellen. Nach 3 min wurde die Trypsinierung (EDTA/Trypsin, Invitrogen, Carlsbad, USA) durch Zugabe von FCS-haltigem DMEM/F12 Medium (5%) gestoppt. Die Zellen wurden pelletiert, in PBS resuspendiert und

die Zellzahl ermittelt. Daraufhin erfolgte die Suspension der Zellen zu verschiedenen Zelldichten in 100 µl Volumen PBS (5×10^6 , 1×10^7 und 5×10^7). Dieses Volumen wurde zunächst auf Eis aufbewahrt und schließlich intratracheal in native C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld) bei Raumtemperatur appliziert. Die histologische Analyse erfolgte wie unter 3.3.1. beschrieben.

2.5.7. Ermittlung der Strahlungsdosis der UV-C Lichtquelle

Zur Ermittlung der jeweils zur Bestrahlung verwendeten Dosis wurde die Petrischale positionsgerecht durch eine Radiometer-Sonde (Vilber Lourmat, Marne-La-Valée, FRA) ersetzt und die Strahlungsmenge/Zeit quantifiziert. Hierbei wurde die Dosis direkt nach dem Aktivieren der Lichtquelle wie auch im zeitlichen Verlauf ermittelt (siehe Tab. 6 im Anhang).

2.5.8. Markierung von MLE-Zellen

Um die tatsächliche Auslastung der Lunge mit Instillat sowie die Effizienz der Zell-Instillation zu überprüfen, wurden 1×10^6 , 5×10^6 oder 1×10^7 gefärbte MLE12-Zellen in 100 µl Instillations-Volumen (DPBS) resuspendiert und anschließend intratracheal appliziert. Als Farbstoff wurde 5-Chloromethylfluorescein Diazetat (CMFDA; Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Die Färbung erfolgte dabei analog den Herstellerangaben für die Verwendung an Zellen in Suspension. Nach der Instillation wurden die Lungen formalinfixiert, in Paraffin eingebettet, Dünnschnitte angefertigt und fluoreszenz-mikroskopisch untersucht.

2.6. Tierexperimentelle Arbeiten

(genehmigt nach Reg. Nr. 937/1063 Regierungspräsidium Tübingen)

2.6.1. Applikation des Thorax-Traumas und der zökalen Ligatur und Punktion

Für die tierexperimentellen Studien wurden männliche C57BL/6-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) im Alter von 8-10 Wochen mit einem Gewicht von durchschnittlich $23,3 \text{ g} \pm 1,8 \text{ g}$ verwendet. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in den Ställen der Bereichstierhaltung der Tierforschungszentrale Ulm bei 21°C Raumtemperatur, 50-60% Luftfeuchtigkeit mit 12 h Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere hatten prä- und postinterventionell freien Zugang zu Futter (Altromin 1314 Forti, Altromin GmbH, Lage/Lippe) und Wasser. In Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung erfolgte die Einteilung der Tiere in verschiedene Gruppen, so dass jeweils eine bestimmte Anzahl für die histologischen und molekularbiologischen Analysen

verwendet werden konnten (Näheres hierzu unter Ergebnisse). Die Zeitpunkte der Organentnahme richteten sich ebenfalls nach der jeweiligen Fragestellung. Die Versuche wurden unter Analgesie (alle 6 h Gabe von Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Pharma GmbH, München)) durchgeführt. Vor jeder Intervention erfolgte die Bestimmung des Tiergewichts (auf 0,1 g genau).

Das initial durch Jaffin et al. beschriebene stumpfe Thoraxtrauma-Modell der Ratte [82], wurde durch Knöferl et al. weiterentwickelt und auf die Maus übertragen [92]. Nach Narkotisierung und Fixation der Tiere wurde diese auf dem Rücken liegend im Bereich von Thorax und Abdomen rasiert. Anschließend erfolgte im Bereich des Thorax eine Markierung, so dass eine abschließend eine exakte Positionierung unter dem Druckzylinder möglich war. Die Markierung diente der Kennzeichnung der Rippenbögen, der Sternummitte und des kaudalen Sternum-Endes. Die narkotisierten Mäuse wurden unter dem von Knöferl et al. [92] beschriebenen Druckwellengenerator (Feinwerkstatt der Uni Ulm) exakt positioniert. Die Ausrichtung erfolgte dabei anhand der vorbenannten Markierungen in einem Abstand von 1,5 cm über dem Thorax. Der untere Teil des Zylinders war vom oberen Teil durch eine 50 µm dicke Mylarfolie (DuPont GmbH, Bad Homburg) getrennt. Durch einen voreingestellten Druck von 13 bar (Flaschendruckminderer, Zinser, Ebersbach) erfolgte nun, mittels der Aktivierung eines elektronisch ausgelösten Hochgeschwindigkeitsventils (Hee-D-24, Festo, Esslingen), das Bersten der Mylarfolie, unter der Verwendung von Druckluft für Atemzwecke (MTI Industriegase AG, Eichingen). (Genauere Informationen zum Aufbau und der Funktion der Versuchsanordnung finden sich bei Knöferl et al.[92])

24 Stunden nach dem ersten Trauma wurde eine polymikrobielle Sepsis [10], durch zökale Ligatur und Punktion induziert. Hierzu erfolgte unter Anästhesie und Fixation der Tiere, über eine abdominale Mittellinieninzision, die Identifikation des Zökums. Dieses konnte nun nach extra-abdominal luxiert und 1 cm proximal des Endes mit einem resorbierbaren Faden (4-0 VicrylTM Polyglactin 910, Ethicon Inc./ Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) ligiert werden. Die Darmassage des angrenzenden Dünndarms wurde dabei nicht beeinträchtigt. Mit einer 22G Kanüle erfolgte dann die proximale und distale Punktion des Zökums sowie die Exprimierung einer geringen Menge Stuhls. Nach Reposition des Zökums wurden der peritoneale und kutane Bauchwanddefekt schichtweise fortlaufend mit 4-0 Ethilon[®] II Polyamidfäden (Ethicon Inc./ Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) verschlossen.

Die Tiere erhielten direkt nach Trauma und nachfolgend alle 6 h Buprenorphin (Temgesic[®],

Essex Pharma GmbH, München) in einer Dosierung von 10 µg/kg Körpergewicht.

Die Versuchstiere der Kontrollgruppen erfuhren alle notwendigen Manipulationen des Thoraxtraumas und der Sepsis, einschließlich Narkose und anschließender Analgesie mit Buprenorphin. Diese Tiere erfuhren jedoch weder ein stumpfes Thoraxtrauma noch eine Ligatur und Punktion des Zökums.

2.6.2. Applikation zellulärer Suspensionen in die murine Lunge

Intratracheale Applikationen von zellulärem Material (apoptotische, nekrotische und vitale MLE12-Zellen bzw. Zelllysate) wurden, wie vorher beschrieben, zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen [124]. Hierzu erfolgte zunächst über eine volatile Spülmaskennarkose, mit einem über einen Vapor (Drägerwerk AG, Lübeck) regulierten Gemisch aus 2,5% Sevofluran (Sevorane™, Abbott, Wiesbaden) und medizinischem Sauerstoff (Westfalen AG, Münster), eine Narkotisierung der Versuchstiere. Durch ein Rotameter (Drägerwerk AG) wurde der Sauerstofffluss auf 0,5 l/min eingestellt. Die Versuchstiere konnten so auf dem Rücken liegend auf einer Plexiglasplatte, mittels eines geeigneten Klebebands, unter Narkose fixiert werden. Zur Instillation wurde diese Platte in einem Winkel von ca. 45° aufgestellt (nachfolgende Schritte erfolgten ohne Narkose). Es wurden jeweils 100 µl der entsprechenden Suspension pharyngeal appliziert und das Aufwachen der Tiere aus der Narkose abgewartet. Durch das Einsetzen der (tiefen) Spontanatmung wurde das jeweilige Instillat vollständig aspiriert (während der Narkose lag eine flache Atmung vor). Im direkten Anschluss an die Instillation, wurden die Tiere aus der Fixierung gelöst und wieder in den Tierkäfig verbracht.

2.6.3. Materialgewinnung am Versuchstier

2.6.3.1. Blutentnahme

Die Versuchstiere wurden einer Überdosis Narkotikum (Sevorane™, Abbott, Wiesbaden) ausgesetzt und anschließend in dorsaler Lage auf einer sterilen Unterlage fixiert. Nachfolgend konnte die Haut des Versuchstiers thorakal durch Inzision am Sternum nach apikal eröffnet werden. Nun erfolgte die mediale Eröffnung des Thorax, sowie die Punktierung des rechten Ventrikels mit einer 20G-Kanüle (B. Braun, Melsungen), der daraufhin mit einer 1 ml Spritze blutentleert wurde. Das so gewonnene Blut konnte schließlich durch die Spritze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt und bis auf weiteres bei 4°C gelagert werden. Im Fall der späteren Isolation von Plasma

befand sich im Konus der 1 ml Spritze Heparin (ca. 50 μ l) (B. Braun, Melsungen).

2.6.3.2. Verarbeitung des Blutes

Das Blut-Heparin Gemisch wurde zentrifugiert (10 min, 10000 x g, 4°C). Auf diese Weise setzte sich das Plasma von den zellulären Blutbestandteilen ab und wurde anschließend in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Die Lagerung des Plasmas bis zur Weiterverwendung erfolgte bei -80°C.

2.6.3.3. Bronchoalveoläre Lavage des linken Lungenflügels

Um die Analyse der Lunge, unabhängig von den im Blut befindlichen Parametern, durchführen zu können, wurde im Anschluss an die Blutentnahme der Lungenkreislauf mittels Punktion des rechten Ventrikels vorsichtig mit 1,5 ml eiskaltem PBS gespült. Zu diesem Zweck erfolgte zuvor eine Inzision des linken Herzohrs.

Um eine optimale Nutzung des Tier-Materials zur Analyse zu gewährleisten, wurde lediglich die linke Lunge lavagiert. Hierzu erfolgte das Abbinden der linken Bifurkation der Trachea an ihrer Basis unter Verwendung einer chirurgischen Klemme sowie die Verlagerung des pulmonalen Herzlappens in den rechten Brustraum. Die präparative Darstellung der Trachea konnte anschließend mit einer spitzen Pinzette ausgeführt werden. Durch eine semi-zirkuläre Inzision der Trachea konnte eine Öffnung erzeugt und ein Katheter (0,58 mm x 0,2 mm, VWR, Darmstadt) eingebracht werden. Dieser Katheter war auf einer 22G-Kanüle (B. Braun, Melsungen) aufgesteckt und an eine 1 ml Spritze angebracht. Der Katheter wurde mit einem Faden um die Trachea fixiert. In diese Spritze wurde zuvor ein Volumen von 300 μ l eiskaltem PBS (steril) gefüllt. Durch vorsichtiges Einspritzen und anschließendes Abziehen wurde nun der rechte Lungenflügel drei Mal gespült. Das final erhaltene BAL-Volumen wurde zur späteren Quantifikation der Zellzahl notiert und die BAL in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg), in das zuvor 5 μ l Proteinaseinhibitorcocktail (Sigma-Aldrich, Carlsbad, USA) gegeben wurden, überführt.

2.6.3.4. Weiterverarbeitung der Bronchoalveolären Lavage

Zur weiteren Verarbeitung wurde die BAL für 10 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand konnte anschließend zu 10 μ l (für Proteinbestimmung) und dem Restvolumen (für Zytokin-Analysen) aliquotiert und bei -80°C gelagert werden. Das Pellet wurde in 100 μ l PBS resuspendiert. Davon wurden 10 μ l anschließend zur Zellzahlbestimmung und 90 μ l für die Anfertigung eines Zytospin verwendet (Dabei wurden die Zellen auf einen

Objektträger übertragen und so weiteren Untersuchungen zugänglich gemacht). In Abhängigkeit der erwarteten Zellzahl erfolgte die Verwendung von jeweils adaptierten Volumina, um eine nachfolgende Zählung der Zellen zu ermöglichen. Das jeweils auf den Zytospin-Träger aufgebrachte Volumen wurde stets auf 100 µl Volumen (durch Zugabe von PBS) eingestellt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Präparat zu erreichen. Der Zytospin wurde für 3 min bei 300 x g durchgeführt.

Die Zytospin-Präparate wurden anschließend für 10 min luftgetrocknet und daraufhin in 100% Methanol für 10 min fixiert. Die so hergestellten Zellpräparate wurden abschließend im Hemacolor®-Verfahren (Merck Millipore, Darmstadt), nach beiliegendem Protokoll, für die mikroskopische Analyse gefärbt. Die verwendete Methode stellt ein Standard-Färbeverfahren dar, bei dem durch Komplexbildung von Eosin-G und Azur-B die DNA (und damit die Zellkerne) angefärbt werden. Somit war es möglich die gefärbten Zellen nach ihrer Kernmorphologie zu differenzieren. Diese Differenzierung erfolgte dreifach (blind) und an jeweils 300 Zellen/Präparat. Der primär verfolgte Zweck bestand dabei darin, die Migration der polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMN) in die Lunge zu quantifizieren. Außerdem konnte bei Beobachtung von Erythrozyten in der BAL auf eine pulmonale Schrankenstörung (Blut-Luft-Schranke) geschlossen werden.

2.6.3.5. Entnahme der einzelnen Lungenlappen

Nach Entnahme der BAL wurde die Klemme an der linken Bifurkations-Basis der Trachea entfernt und zunächst die rechtsliegenden Lungenlappen (Ober-, Mittel-, Unter- und Herzlappen) entnommen. Anschließend konnten diese jeweils voneinander separiert, mit eiskaltem PBS (äußerlich) abgespült und für die weitere Verwendung separat in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) in flüssigem Stickstoff (MTI Industriegase AG, Neu-Ulm) schockgefroren werden. In gleicher Weise wurde mit dem lavagierten linken Lungenlappen verfahren. Die weitere Aufbewahrung der Organpräparate erfolgte bei -80°C. Für die anschließenden Analysen wurden die Lungenlappen wie folgt verwendet:

Der rechte Oberlappen für Zytokin-Analysen, der rechte Mittellappen für Myeloperoxidase-Messung, der rechte Unterlappen und der Herzlappen für die Westernblot-Analyse sowie der linke Lungenlappen für mögliche Nachmessungen.

2.6.3.6 Präparation und Entnahme formalinfixierter Lungen

Um Organe für die immunhistologischen Untersuchungen an Dünnschnitten zu gewinnen, wurden die Tiere zunächst den jeweiligen Studien unterzogen. Dabei waren in jeder

Interventions- und Kontrollgruppe Tiere (n = 3-4) für die histologische Untersuchung im Anschluss vorgesehen. Diese Tiere wurden im Anschluss an eine Sevorange-Überdosis durch Inzision am Herzohr entblutet. Anschließend wurde wie vorbeschrieben der Thorax eröffnet und analog der BAL-Präparation ein Katheter intratracheal positioniert. Über diesen Katheter wurde nun eine 10% Formalinlösung in die Lunge verabreicht. 1 min nach dieser Instillation wurde der Katheter gezogen und die Trachea unmittelbar mit einem Faden abgebunden, so dass das Formalin in der Lunge verblieb. Die Lunge wurde schließlich zusammen mit den assoziierten Organen (Lunge mit Trachea, Oesophagus, Herz und Thymus) in ein mit Formalinlösung befülltes Röhrchen (Flacon®) überführt und für die weitere Verwendung bei 4°C für mindestens 24 h aufbewahrt.

2.6.4. Analysen am Organmaterial der Versuchstiere

2.6.4.1. Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität an Lungenhomogenaten

Zur Bestimmung des pulmonalen Influx neutrophiler Granulozyten (PMN) und deren Aktivierungsgrad wurde die Aktivität des Hämoproteins Myeloperoxidase (MPO) bestimmt [1]. Dieses ist ein Schlüsselprotein azurophiler Granula reifer neutrophiler Granulozyten. Durch Spülung des Lungenkreislaufs im Vorfeld der Probenentnahme war gewährleistet, dass die gemessene MPO-Aktivität auf Granulozyten zurückgeführt werden konnte, deren Influx bereits erfolgt war, deren Migration gerade erfolgte oder die MPO im Rahmen des inflammatorischen Geschehens in die extrazelluläre Matrix freigesetzt haben. Im Vorfeld der MPO-Bestimmung erfolgte die Herstellung der erforderlichen Lösungen:

Puffer 1: 0,08M KPP pH 5,4 (10,35g KH_2PO_4 /950ml *Aqua dest.* + 0,91g K_2HPO_4 /50ml *Aqua dest.*)

Puffer 2: 0,05M KPP pH 6,0 (6,12g KH_2PO_4 /900ml *Aqua dest.* + 1,14g K_2HPO_4 /100ml *Aqua dest.*)

Puffer 3: 0,05M KPP pH 6,0 + 0,5% HTAB (0,5g HTAB/100ml Puffer 2)

Die Lungenlappen (Mittellappen, rechts) wurden in 5 ml Reaktionsgefäßen (Glasröhrchen, VWR, Darmstadt) überführt und mit Puffer 3 überschichtet. Anschließend wurde das Gewebe mit dem Ultra Turrax T 25 (IKA-Werke, Staufen) bei 16000 x g auf Eis homogenisiert. Nun schloss sich die schüttelnde Inkubation der Homogenate in einem auf 60°C vorgeheiztem Wasserbad (SW23; Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) für 2 h an (zur Inaktivierung der Pseudoperoxidase). Die Lagerung der Proben erfolgte über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurden die Proben zunächst bei 3950 x g für 15 min zentrifugiert.

Währenddessen wurden die MPO-Standards (1000 U/l bis 15,6125 U/l) durch Verdünnung in Puffer 3 in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) hergestellt und eine Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB) zu 1 mg/ml in DMSO verdünnt (lichtgeschützte Aufbewahrung). Schließlich wurden zwei Wasserstoff-Peroxid-Lösungen (H₂O₂) hergestellt:

Lösung 1: 100 µl 30% H₂O₂ in 30 ml H₂O (1:300 Verdünnung)

Lösung 2: 670 µl Lösung 1 in 40 ml Puffer 1 (pH 5,4).

Zur Bestimmung der MPO-Aktivität wurden daraufhin 25 µl der Proben bzw. des Standards jeweils in Doppelbestimmung auf eine 96-Well Platte (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA), zusammen mit 25 µl TMB-Lösung und 200 µl der H₂O₂-Lösung 2 pipettiert. Die Proben wurden für 5 min bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert und die Färbereaktion mit 50 µl 2 M Schwefelsäure abgestoppt. Die photometrische Bestimmung der MPO-Aktivität erfolgte bei einer Extinktion von 450 nm mit dem Tecan Sunrise Reader (Tecan, Crailsheim). Im Vorfeld der sich anschließenden Proteinbestimmung wurden 200 µl einer jeden Probe in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und für Nachmessungen bei -80°C konserviert.

2.6.4.2. Proteinbestimmung am Myeloperoxidasen-Probenmaterial

Das nicht zur Bestimmung der MPO-Aktivität verwendete Probenmaterial wurde zunächst mit 100 µl Perchlorsäure zur Proteinfällung versetzt und daraufhin resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 3950 x g für 10 min. Nun wurde der Überstand verworfen und die Proben zwei aufeinanderfolgenden Waschschritten, durch Zugabe von je 3 ml *Aqua dest.* und Zentrifugation bei 3950 x g für jeweils 10 min, unterzogen. Nach erneutem Verwerfen des Überstands erfolgte die Zugabe von 2 ml einer 0,5 N Natriumhydroxid-Lösung (NaOH). Einer weiteren Suspension schloss sich die Inkubation für 30 min in einem auf 56°C erhitztem Wasserbad an. Während dieser Inkubation wurde der Protein-Standard auf einer 96-Well Mikrotiter-Platte (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) vorgelegt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in der MPO-Probe wurden schließlich 15 µl der Probe bzw. des Standards mit 300 µl Reagenz C (4% Kupfersulfatlösung/BCA-Reagenz im Verhältnis 1:51) versetzt (jeweils in Doppelbestimmung) und für 30 min bei 37°C inkubiert (modifizierte Methode nach Smith et al.) [163]. Die Messung erfolgte bei einer Extinktion von 562 nm mit dem Tecan Sunrise Reader (Tecan, Crailsheim).

Zur Bestimmung der absoluten MPO-Aktivität wurde für jede Probe die MPO-Messung (bei 450 nm) mit der Proteinkonzentration (bei 562 nm) verrechnet, so dass abschließend die absolute Protein-Aktivität der Myeloperoxidase in U/g Protein ermittelt werden konnte.

2.6.4.3. Proteinbestimmung an Bronchoalveolärer Lavage- und Westernblot- Probenmaterial

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Hierzu wurden 10 µl der Proben mit *Aqua dest.* verdünnt (BAL 1:10 und Lungengewebe 1:40) und jeweils 10 µl der Verdünnung zusammen mit einer fünfstufigen Standardreihe auf eine 96-Well-Platte aufgetragen (96F, NUNC™, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Nun wurden 200 µl einer Arbeitsreagenz (BCA-Reagenz A/ Reagenz B im Verhältnis 51:1) zugegeben und die Proben für 30 min bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Abschließend erfolgte die Messung der Proteinkonzentration bei einer Extinktion von 562 nm mit dem Tecan Sunrise Reader (Tecan, Crailsheim).

2.6.4.4. Westernblot Analysen

Zur Verwendung für die Westernblot Analysen wurden die Lungenlappen (rechter Herz- und Unterlappen) in 2 ml Eppendorfgefäße mit 200 µl RIPA-Puffer (1% Igepal® CA-630, 0,5% Natrium-desoxycholsäure und 0,1% Natrium-Dodecylsulfat), 50 µl Proteinaseinhibitorcocktail, 10 µl PMSF-Lösung (10 mg/ml PMSF in Isopropanol) sowie 10 µl Natriumorthovanadat überführt (alle Sigma-Aldrich, Carlsbad, USA). Die Homogenisierung wurde auf Eis, wie unter 3.2.4.1. beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und aliquotiert bei -80°C konserviert.

Um die Expression der aktiven Caspase-3 untersuchen und quantifizieren zu können, wurden Westernblot Analysen durchgeführt. Dabei kamen 18% Polyacrylamid-Gele zur Anwendung. Zur Herstellung der Gele wurden in Kammern zwei zusammengefügte Glasplatten (Bio-Rad, München) mit definiertem Zwischenraum (1,5 mm) in spezielle Halterungen eingespannt (Bio-Rad, München). Daraufhin erfolgte die Herstellung der Polyacrylamid-Lösung, bestehend aus 6 ml Rotiphorese® (Roth, Karlsruhe), 2,5 ml Lower-Buffer (4 x Tris-HCL/SDS; pH 8,8), 1,8 ml *Aqua dest.*. Zur Einleitung der Polymerisationsreaktion wurden anschließend 5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 10 µl 25% Ammonium-Persulfat (APS) zugesetzt (beide Sigma-Aldrich,

Carlsbad, USA). Unmittelbar im Anschluss wurde diese Lösung in die vorgenannten Kammern überführt. Während der anschließenden Polymerisation für 30 min, erfolgte die Herstellung einer Polyacrylamid-Lösung für das Sammelgel. Diese setzte sich aus 1,6 ml Rotiphorese® (Roth), 2,5 ml Upper-Buffer (4 x Tris-HCL/SDS; pH 6,8) und 5,9 ml *Aqua dest.* zusammen. Zur Aktivierung der Polymerisation wurden 20 µl TEMED und 40 µl 25% Ammonium-Persulfat (APS) verwendet. Die Lösung für das Sammelgel wurde schließlich auf das polymerisierte Gel (Trenngel) gegeben und abschließend der Kamm (Bio-Rad, München) eingesetzt. Einer 15 min Polymerisation folgte die Aufbewahrung der, in feuchte Tücher gewickelten, Gele bei 4°C (Lagerung nicht länger als 4 Tage).

Die Gele wurden zur Gelelektrophorese in das Kammer-System (Bio-Rad, München) eingesetzt und mit Laufpuffer (Tris-HCl/ SDS/ Glyzine) befüllt. Das Probenmaterial wurde, in der Proteinkonzentration von 60 µg/Probe, in 20 µl *Aqua dest.* verdünnt. Darauf folgend wurden die Proben mit 15 µl Laemmli Sample Buffer (mit 5% Mercaptoethanol) (Bio-Rad, München) versetzt, für 7 min bei 96°C aufgekocht und anschließend unmittelbar auf Eis transferiert (Denaturierung der Proteine). Nach einer kurzen Zentrifugation (300 x g), wurde das Probenmaterial in die Ladetaschen des Gels pipettiert. Als Marker wurde der Full Range Marker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Elektrophorese wurde für eine Laufdauer von 2 h 45 min bei 125 V durchgeführt.

Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Gele zum Blotting auf zuvor in Methanol getränkte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen in eine Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell (beide Bio-Rad, München) überführt. Diese Membranen befanden sich zu diesem Zweck auf einem in Transferpuffer (Glyzine/Tris/SDS/Methanol) getränkten Zellulosefilter (Bio-Rad). Ein zweiter (ebenfalls getränkter) Filter wurde auf dem Gel positioniert. Schließlich wurde die Blotting-Kammer geschlossen und eine weitere Elektrophorese für zwei Stunden bei 0,18 A durchgeführt.

Die nun das gesamte Proteingemisch tragende Membran wurde für 1,5 h mit 5% Milch/ *Tris-buffered saline with Tween20* (TBST) (Sigma-Aldrich, Carlsbad, USA) schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diese Prozedur konnten unspezifische Bindungen gesättigt und damit die Spezifität der nachfolgenden Schritte erhöht werden. Parallel zum vorangehenden Arbeitsschritt erfolgte die Verdünnung des primären Antikörpers (Cleaved Caspase-3 (Asp175) rabbit mAb, #9661L, Cell Signaling, Danvers, USA; 1:500) in 5 ml 5% Milch/ TBST in einem 50 ml Röhrchen (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Die Membran wurde schließlich in dieses Röhrchen transferiert und über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran jeweils drei Mal für 15 min in TBST

gewaschen, schließlich in ein 50 ml Röhrchen mit entsprechend verdünntem Sekundär-Antikörper überführt (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, #7074 (HRP = Meerrettich-Peroxidase), Cell Signaling, Danvers, USA; 1:1500) und daraufhin für 1 h schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurde die Membran für jeweils 10 min drei Mal in TBST und abschließend ein Mal in TBS gewaschen. Zur Detektion der Zielproteine erfolgte die Überschichtung mit ChemiGlow® (unverdünnt) (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) und die Detektion der Chemo-Lumineszenz auf Röntgenfilmen in einem Entwickler (Eastman Kodak Company, Rochester, USA).

Als Ladekontrolle diente ein Re-Blot der β -Aktin-Proteinfraction, welche durch die experimentellen Interventionen nicht beeinflusst wurde. Hierzu erfolgte die Verwendung der gekühlten Membranen vom Vortag (Caspase-3 Westernblot) in einem 50 ml Polypropylenröhrchen mit 5 ml einer 1:10 in *Aqua dest.* verdünnten Stripping Solution (Chemicon, Limburg) die für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Rollmischer inkubiert wurde. Nach zwei 5 min Waschschritten mit TBST wurden die Membranen für 30 min in 5%-iger Milch/ TBST (s.o.) auf dem Schüttelmixer geblockt. Über Nacht bei 4°C wurden die Membranen dann in 5 ml 1:1000 in 5%-iger Milch verdünnten β -Aktin Primärantikörpers (#4967, Cell Signaling, Danvers, USA) auf dem Rollmischer inkubiert. Die Waschschrritte und Entwicklung der Re-Blots erfolgten entsprechend dem vorgenannten Verfahren, mit dem Unterschied, dass die Chemilumineszenzreagenz (ChemiGlow®, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) hier 1:5 in TBS verdünnt eingesetzt wurde.

2.6.5. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

2.6.5.1. DuoSet® ELISA Kits

Für die Bestimmung von Fas/FasL/KC/MIP-2 und G-CSF in der BAL, im Plasma und im Lungenhomogenat wurde ein DuoSet® ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) mit einer Sensitivität von 15,6-1000 pg/ml bzw. 15,6-2000 pg/ml verwendet. Die Testdurchführung erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur und zwischen den einzelnen Inkubationen jeweils drei Waschschrritte mit 300 μ l Waschpuffer (0,05% Tween20 in PBS, pH 7,2-7,4; beide Sigma-Aldrich, Carlsbad, USA) durchgeführt. Die Microtiter-Platte (MaxiSorp™, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) wurde zunächst über Nacht bei 4°C mit 100 μ l Capture-Antikörper in einer Konzentration von 0,4 μ g/ml inkubiert sowie anschließend unspezifische Bindungsstellen mit 300 μ l 1% BSA in PBS (Sigma-Aldrich, Carlsbad, USA) für 1,5 h geblockt. Nachfolgend wurde die Microtiter-Platte mit jeweils 100 μ l der Proben (bzw. in

sequentiell durchgeführten *Assays* einem veränderten Volumen) bzw. der Verdünnungen des Standards (jeweils in Doppelbestimmung, dem Volumen der Proben entsprechend) über Nacht bei 4°C inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation mit 100 µl Detektions-Antikörper (50 ng/ml biotinyliert, aus Ziege gegen Maus) je Well für eine Stunde. Im nächsten Schritt wurde die Platte mit 100 µl Streptavidin-HRP (R&D Systems, Minneapolis, USA), für eine Stunde inkubiert. Die Farbreaktion des Tests konnte durch Zugabe von 100 µl Tetramethylbenzidin-Substrat (Mischung von Substrat A und B, analog den Herstellerangaben) induziert und nach 30 min durch Zugabe von 50 µl 2 N Schwefelsäure (H₂SO₄; Sigma-Aldrich, Carlsbad, USA) abgestoppt werden. Die Absorption wurde bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm mit einem *Microplate-Reader* (Tecan, Crailsheim) photometrisch ermittelt. Zur Berechnung der jeweiligen Konzentrationen in der BAL, dem Plasma und dem Lungenhomogenat wurde anhand der Standards mit SigmaPlot Version 11 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath) eine Standardkurve erstellt und hiernach die Konzentrationen der Probenlösungen in pg/ml, bzw. wenn auf die Proteinkonzentration (siehe 3.2.4.3.) bezogen in pg/mg, Protein ermittelt.

2.6.5.2. BD OptEIA™ ELISA Set (Becton Dickinson & Co, Franklin Lakes, USA)

Für die Bestimmung der Zytokine/ Chemokine MCP-1/ TNFα/ IL-6/ IL-10 und IL-1β in BAL, Plasma und Lungenhomogenat wurde das OptEIA™ ELISA Set (Becton Dickinson & Co, Franklin Lakes, USA) mit einer Sensitivität von 15,6-1000 pg/ml bzw. 15,6-2000 pg/ml verwendet. Die Testdurchführung erfolgte nach dem Datenblatt des Herstellers. Alle Inkubationsschritte wurden (wenn nicht anders beschrieben) bei Raumtemperatur und zwischen den einzelnen Inkubationen Waschschrte entsprechend den Hersteller-Angaben mit 300 µl Waschpuffer (0,05% Tween20 in PBS, pH 7,2-7,4) durchgeführt. Die Microtiter-Platte (MaxiSorp™, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) wurde zunächst über Nacht bei 4°C mit 100 µl Capture-Antikörper in einer Konzentration von 0,4 µg/ml inkubiert. Daran anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 300 µl 1% BSA in PBS für 1,5 h geblockt. Dann wurde die Microtiter-Platte mit jeweils 100 µl der Proben (in sequentiell durchgeführten Assays entsprechend verdünnt) bzw. der Verdünnungen des Standards (jeweils in Doppelbestimmung) über Nacht bei 4°C inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation mit 100 µl Detektions-Antikörper (50 ng/ml, biotinyliert, aus Ziege gegen Maus) pro Well für eine Stunde. Im nächsten Schritt wurde die Platte mit 100 µl Streptavidin-HRP für eine Stunde inkubiert. Die Farbreaktion des Tests wurde durch Zugabe von 100 µl Tetramethylbenzidin-Substrat (Mischung von Substrat A und B, analog den

Herstellerangaben) induziert und nach 30 min durch Zugabe von 50 µl 2 N Schwefelsäure (H₂SO₄) abgestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm mit einem Microplate-Reader (Tecan, Crailsheim) photometrisch ermittelt. Zur Berechnung der jeweiligen Konzentrationen in BAL, Plasma und Lungenhomogenat wurde anhand der Standards mit SigmaPlot Version 11 (SPS Science Software GmbH, Erkrath) eine Standardkurve erstellt und hiernach die Konzentrationen der Probenlösungen in pg/ml, bzw. wenn auf die Proteinkonzentration (siehe 3.2.4.3.) bezogen in pg/mg, Protein ermittelt.

2.7. Histologische Analysen

2.7.1. Paraffin-Einbettung und Anfertigung von Dünnschnittpräparaten

Zur Paraffinierung der Lungen wurden die formalin-fixierten Organe (Lunge mit Trachea, Oesophagus, Herz und Thymus) der Versuchstiere zunächst in eine Petrischale überführt, nicht pulmonale Organe entfernt, und die Lungenflügel getrennt in Plastikeinbettkassetten (Simport Histosette® I Tissue Embedding Cassette 45° Angle, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) eingelegt. Durch fünfstündige Verwahrung unter fließendem Wasser, wurde das überschüssige Formalin ausgespült. Die anschließende Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-, 80%-, 90%-, 100%-iges Ethanol, Methylbenzoat, Toluol, Xylol und erneut 100%-iges Ethanol) wurde in dem Einbettautomaten Leica Asp200 (Leica Microsystems, Wetzlar) durchgeführt. Nach weiteren 24 h konnten die Gewebeproben in einer Ausgießstation (Microm EC-350-1, Microm, Walldorf) in Paraffinblöcke eingebettet werden. Nach Auskühlung der Blöcke auf einer -4°C kalten Platte erfolgte das Anfertigen von ca. 1-2 µm dicken Schnitten mit dem Microtom (Microm HM450; Microm, Walldorf) die direkt im Anschluss daran in ein auf 37°C beheiztes Wasserbad überführt und schließlich auf Objektträgern (Menzel-Gläser, VWR, Darmstadt) aufgezogen und getrocknet wurden.

2.7.2. *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling* von Lungengewebschnitten

Um den apoptotischen Prozess auf zellulärer Ebene im Gewebe sichtbar zu machen, wurden über das TUNEL-Verfahren die im Rahmen der Apoptose entstehenden DNA-Bruchstücke spezifisch angefärbt. Hierzu kamen ca. 1-2 µm dicke Gewebsschnitte der in Paraffin eingebetteten Lungen der Versuchstiere zur Anwendung, welche mit dem *In situ* Cell Death Detection Kit TMR red (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Instruktion des Herstellers angefärbt wurden.

Dabei erfolgte zunächst die Deparaffinierung der Schnitte durch zweimaliges Waschen in

Xylol, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe (100%-, 90%-, 80%-, 70%-iges Ethanol) und einem Waschschrift mit *Aqua dest.*. Die Proben wurden anschließend für 15 min bei 37°C mit einem Proteinase-K-Puffer (20 µg/ml in 10 mM Tris/HCl pH 7,6) angedaut. Nach zwei Mal 3 min Waschen mit DPBS, wurde jeder Schnitt mit 50 µl einer Mischung aus Enzym- und Markierungs-Lösung des *In situ Cell Death Detection Kits* (Roche Diagnostics, Mannheim) für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Negativkontrollen wurden nur mit der Markierungs-Lösung überschichtet. Nach drei Waschschriften in DPBS und 15 min Kernfärbung mit Bisbenzimidlösung (0,5 mg/l PBST) unter Lichtabschluss, wurden die Schnitte erneut zwei Mal mit DPBS gewaschen und mit *Dakocytomation Fluorescent Mounting Medium* (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) überschichtet. Abschließend wurden die Schnitte mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Fluoreszenz der Probe wurde durch das verwendete Einbettmedium konserviert.

2.7.3. Immunhistochemische Färbung von Lungengewebschnitten

Für die Darstellung des Effekts der Instillation apoptotischer und nekrotischer Zellen auf intrapulmonaler Ebene, wurde eine immunhistochemische Färbung an Lungengewebschnitten der entsprechenden Tiere durchgeführt.

Hierzu erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte nach 5 min Hitzefixierung (bei 56°C). Die in *Aqua dest.* gewaschenen Schnitte wurden 10 min in vorgewärmten Citratpuffer (2 g Zitronensäure in einem Liter *Aqua dest.*, pH 6,0) in einer Mikrowelle bei 160 W erhitzt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit *Aqua dest.* wurden die Objektträger zum Blocken endogener Peroxidasen für 10 min mit 3% Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂) überschichtet und daraufhin 5 min mit PBST gewaschen. Das Blocken unspezifischer Bindungen erfolgte mit 50 µl Ziegennormalserum (aus Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories Ltd., Burlingame, USA; 1:20 in PBST verdünnt) je Schnitt. Über Nacht bei 4°C erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 50 µl des 1:200 in PBST verdünnten Primäantikörpers (Anti-Caspase-3 aus Kaninchen, #9661L, Cell Signaling, Danvers, USA).

Am zweiten Tag wurden die Schnitte zunächst drei Mal mit PBST gewaschen und anschließend für 1 h mit dem 2. Antikörper (aus Vectastain® ABC Kit), der 1:100 in 1,5% Ziegennormalserum/PBST verdünnt wurde, inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften in PBST wurden die Objektträger mit 50 µl der präparierten ABC-Reagenz (ein Tropfen Reagenz A/ ein Tropfen Reagenz B in 5 ml PBS) überschichtet. Hierauf folgte eine 45 min Inkubation (unter Lichtabschluss) sowie drei weitere Waschschriften mit PBST, 15 min Kernfärbung mit Bisbenzimidlösung (0,5 mg/l PBST) bei Dunkelheit. Nun schloss sich eine

jeweils 2 min Behandlung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-, 96%-, zwei mal 100%-iges Ethanol) und zwei mal 5 min Inkubation in Xylol an. Abschließend wurden die Präparate mit Entellan® überschichtet (Merck KGaA, Darmstadt) und mit Deckgläsern eingedeckt.

2.7.4. Hemacolor®-Färbung

Für die Zell-Differenzierung der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit sowie zur Darstellung der MLE12-Zellen nach UV-C-Exposition kam die Hemacolor®-Schnellfärbung von Blutaussstrichen (Merck KGaA, Darmstadt) zur Anwendung. Die Objektträger mit dem Probenmaterial wurden hierzu zunächst in Methanol fixiert (10 min) und abschließend luftgetrocknet. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation des Objektträgers in Hemacolor®-Lösung 1, Hemacolor®-Lösung 2, Hemacolor® Lösung 3 (jeweils für 3 sec) und abschließend in einer Pufferlösung (pH 7,2) jeweils in gesonderten Glasküvetten. Daraufhin wurden die Präparate getrocknet und mit Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt) überschichtet sowie mit einem Deckglas eingedeckt. Die Aufbewahrung erfolgte unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur in einer Kassette.

2.7.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Darstellung der Gewebestruktur wurden Lungendünnschnitte nach dem Hämatoxylin-Eosin-(H&E) Färbeverfahren gefärbt. Hierzu erfolgte zunächst die Deparaffinierung der Schnitte durch zweimaliges Waschen in Xylol, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe (100%-, 90%-, 80%-, 70%-iges Ethanol) und einem Waschschriff mit *Aqua dest.*. Anschließend wurden die Schnitte in Mayers Hämalaun Lösung für drei min in einer Glasküvette gebläut, nachfolgend für 2 sec in 0,1% HCl-Lösung gespült und dann für 3-5 min mit Leitungswasser gewaschen. Nun wurden die Schnitte für 3 min in 0,1% Eosin B-Lösung gefärbt, für 30 sec in Leitungswasser gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-, 80%-, 90%-, 100%-iges Ethanol und 2x Xylol) entwässert. Im letzten Schritt wurden die Präparate mit Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt) überschichtet und mit einem Deckgläschen eingedeckt. Die Aufbewahrung der H&E-Präparate erfolgte in Kassetten bei Raumtemperatur.

2.8. Mikroskopische Beurteilungen

Alle mikroskopischen Betrachtungen wurden mit dem Mikroskop Axio Imager M1 (Carl

Zeiss AG, Oberkochen) und der zugehörigen Software Axio Vision Version 4.4 (Carl Zeiss AG) durchgeführt. Hierbei wurde für die unterschiedlichen Methoden wie folgt vorgegangen:

Immunhistochemie: Repräsentative Bildausschnitte wurden fotografiert.

BAL: 300 Zellen pro Objektträger wurden systematisch ausgezählt und nach Zelltyp klassifiziert (Monozyten, Granulozyten und Leukozyten). Mit Hilfe der berechneten relativen Zellzahl der BAL wurde der prozentuale Anteil oder die Gesamtzahl an alveolär immigrierten neutrophilen Granulozyten bestimmt.

TUNEL: 10 Gesichtsfelder pro Präparat wurden systematisch (blind) ausgezählt. TUNEL positive Zellen wurden definiert als solche Zellen, deren Eigenfluoreszenz die unspezifische Hintergrundfluoreszenz deutlich übertrifft.

2.9. Statistik

Alle aufgeführten Messdaten wurden mit Hilfe der Datenanalysesoftware SigmaStat (Systat, San José, USA) auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Nach Ermittlung der Normalverteilung in der Grundgesamtheit wurde, wenn nicht anders angegeben, eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way-ANOVA, *analysis of variance*) für unabhängige Stichproben durchgeführt. Waren die Daten nicht normalverteilt, kam stattdessen ein ANOVA on Ranks zur Anwendung. Diesen Varianzanalysen folgte zur Ermittlung von statistisch signifikanten Unterschieden ein post-hoc-Test nach Student-Newman-Keuls (SNK) oder ein Mann-Whitney-U-Test (U-Test). Bei $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant erachtet. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Apoptose-Induktion an Maus-Lungen-Epithelzellen

Zunächst wurde ein Protokoll zur reproduzierbaren Induktion der Apoptose durch UV-C Exposition an MLE12-Zellen etabliert. Hierzu erfolgte die Untersuchung verschiedener Konditionen um eine reproduzierbare und möglichst hohe Anzahl an apoptotischen Zellen zu generieren. Als letztlich optimale Kondition stellte sich das unter 2.5.5. beschriebene Vorgehen der UV-C Exposition heraus.

Der Vitalitätsstatus der Zellen wurde im Rahmen unterschiedlicher Untersuchungsverfahren evaluiert.

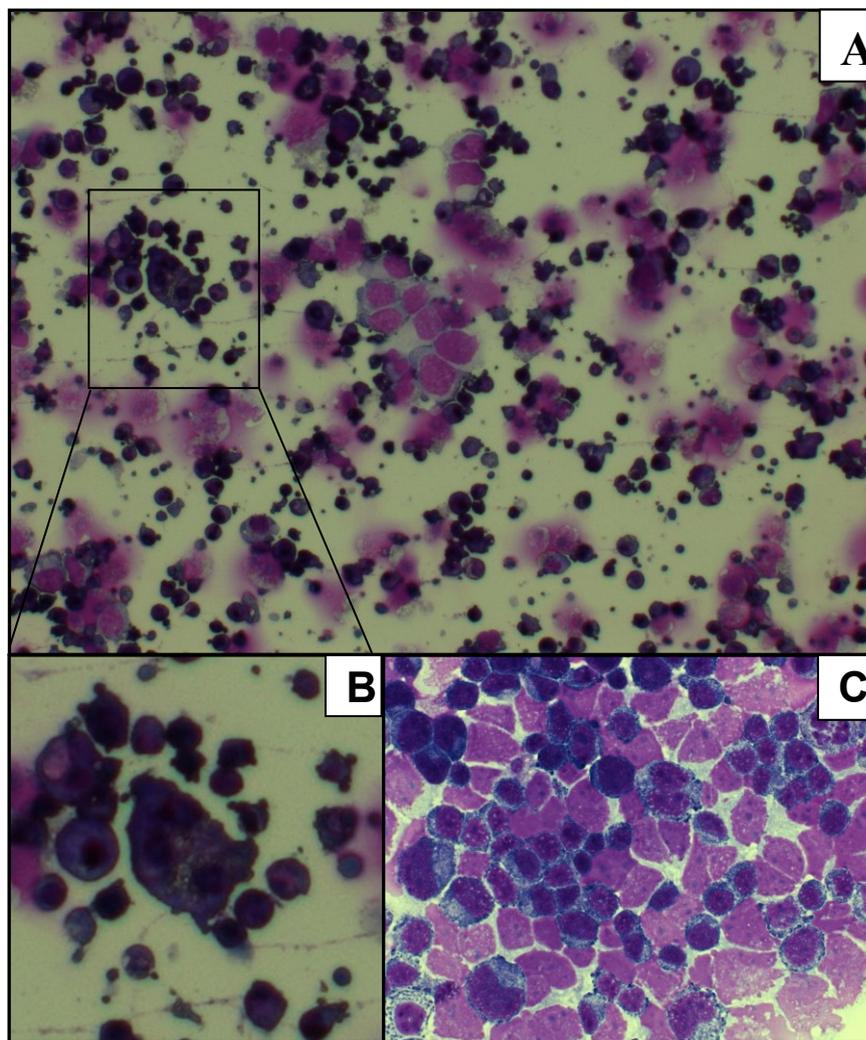


Abb. 1: A) 100x Vergrößerung eines Zytospin-Präparates von apoptotischen Maus-Lungen-Epithelzellen 360 min nach UV-C Bestrahlung und anschließender Hemacolor-Färbung. B) 400x vergrößerter Ausschnitt aus A) zur besseren Darstellung der apoptotischen Zellmerkmale. Zu erkennen sind die deutlich geschrumpften, dunkel gefärbten, karyorektischen Maus-Lungen-Epithelzellen, welche darüber hinaus abgeschnürte „Zellbläschen“ (apoptotische Körperchen) aufweisen. C) 200x Vergrößerung nativer, trypsinierter Maus-Lungen-Epithelzellen. Es sind zytoplasmatische (blau) und nukleäre (violett) Zellbestandteile zu erkennen.

Die hier dargestellte Aufnahme zeigt MLE12-Zellen nach 60 sec UV-C Bestrahlung (Abb. 1A/B). In der vergrößerten Aufnahme (Abb. 1B) sind Merkmale apoptotischer Zellen zu beobachten. Diese Zellen weisen eine charakteristische dunklere Färbung und sogenannte apoptotische Körperchen auf, welche als abgeschnürte Bläschen in der mikroskopischen Aufnahme zu erkennen sind.

Neben der morphologischen Untersuchung wurden die Zellen bezüglich ihres Vitalitätsstatus durch die Färbung mit den Vitalfarbstoffen AnnexinV und 7-AAD charakterisiert. Hierbei wurden die untersuchten Zellpopulationen in a) vital, b) früh apoptotisch und c) spät apoptotisch/sekundär nekrotisch differenziert. Unter Verwendung von Fluoreszenz-markierungen (AnnexinV-FITC und 7-AAD-PE) wurde ein durchflusszytometrischer *Array* der einzelnen Zellpopulationen durchgeführt (siehe 3.1.3).

Die UV-C bestrahlten MLE12-Zellen wurden jeweils zum Zeitpunkt $t_{0\text{min}}$, $t_{35\text{min}}$ und $t_{75\text{min}}$ hinsichtlich ihrer Vitalität untersucht (Abb. 2). Es zeigte sich, dass durch das verwendete Protokoll (siehe 2.5.5.) zum Zeitpunkt t_0 (~6 h nach UV-C Exposition) eine Apoptoserate von über 70% erreicht wurde. Demgegenüber war eine Nekroserate (inklusive sekundär nekrotischer und spät apoptotischer Zellen) von etwa 20% und ein Anteil noch vitaler Zellen von weniger als 5% zu beobachten.

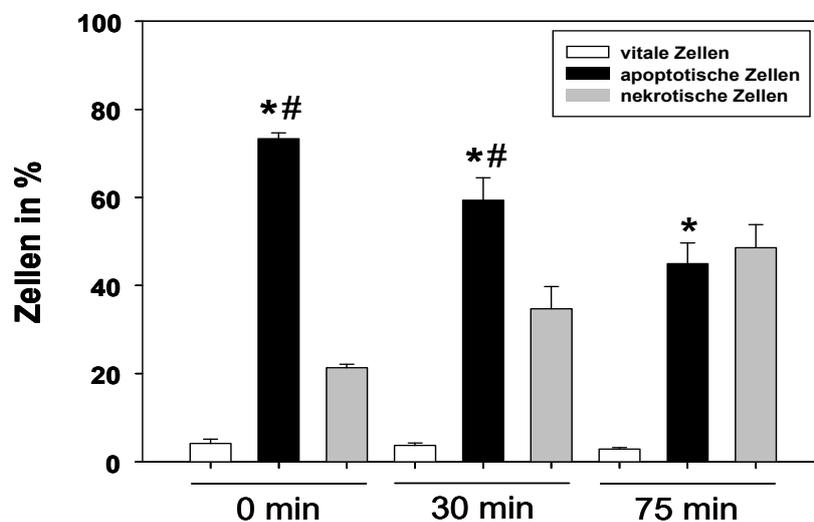


Abb. 2: Im Anschluss an die UV-C (Ultraviolette Strahlung der Wellenlänge 200-280 nm) Exposition wurden die Maus-Lungen-Epithelzellen AnnexinV/ 7-Actinoamomycin gefärbt und der Vitalitätsstatus 360 Minuten (min) (~0 min), 390 min (~30 min) und 435 min (~75min) nach Exposition durchflusszytometrisch bestimmt. $n=4$, one-way ANOVA, SNK, $*p<0,05$ vs. korrespondierende vitale Zellen, $\#p<0,05$ vs. korrespondierende nekrotische Zellen. Mittelwert \pm SEM aus zwei unabhängigen, jeweils in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

Um die induzierten zytologischen Prozesse im zeitlichen Verlauf zu untersuchen schloss sich im Folgenden die durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach weiteren 35 min und

75 min an. Hierbei wurde eine schwach abnehmende Anzahl an vitalen Zellen ($t_{35\text{min}} < 4\%$, $t_{70\text{min}} < 3\%$) beobachtet. Für die Fraktion der sekundär nekrotischen/spät apoptotischen Zellen, zeigte sich demgegenüber ein steter Zuwachs über die untersuchten Zeitpunkte ($t_{30\text{min}} > 35\%$, $t_{75\text{min}} > 50\%$) hinweg. Demgegenüber war parallel hierzu ein Rückgang der Anzahl apoptotischer Zellen ($t_{30\text{min}} < 60\%$, $t_{75\text{min}} < 45\%$) festzustellen.

Als ergänzendes Verfahren zur Bestimmung des Vitalitätsstatus der MLE12-Zellen nach UV-C Exposition wurde eine TUNEL-Färbung mit anschließender FACS-Analyse durchgeführt (Abb. 3) (siehe 2.6.5.). Hierbei zeigte sich, dass 6 h nach UV-C Exposition ein Anteil von 82,3% TUNEL positiver Zellen zu beobachten war ($n=3$). Im Gegensatz hierzu wurde bei den nicht exponierten Kontrollzellen mit 0,1% ein vernachlässigbar geringes TUNEL positives Signal nachgewiesen.

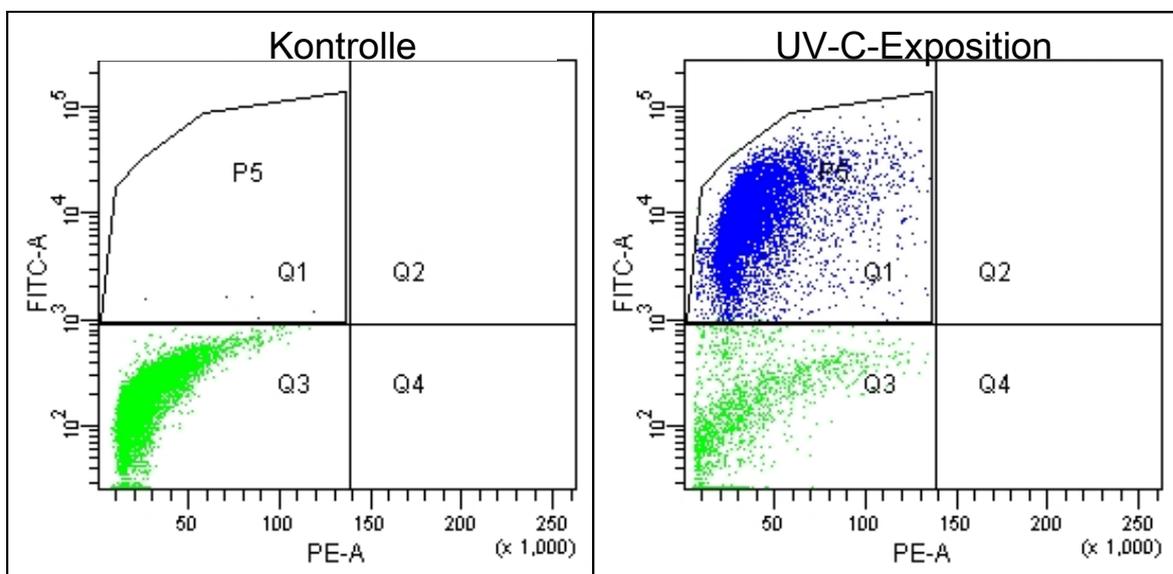


Abb. 3: Repräsentative Durchflusszytometrische Profile der TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) gefärbten Maus-Lungen-Epithelzellen nach Kontrollprozedur (links) und UV-C- (Ultraviolette Strahlung der Wellenlänge 200-280 nm) Exposition (rechts). Grün eingefärbt sind dabei die TUNEL-negativen, vitalen Zellen (in Q3). Blau eingefärbt sind die TUNEL-positiven, apoptotischen Zellen (in Q1). Das Experiment wurde einmal in Triplikaten durchgeführt.

Durch die Verwendung des Chemolumineszenz-Verfahrens Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega, Madison, USA) wurde die intrazelluläre Caspase-Aktivität der MLE12-Zellen nach UV-C Exposition bestimmt (siehe 2.5.3.). Die nachfolgende Messung ergab, dass die Caspase-Aktivität in den UV-C exponierten MLE12-Zellen zum untersuchten Zeitpunkt (6 h nach Exposition) etwa um den Faktor 3 gegenüber den nicht exponierten Zellen erhöht war (Abb. 4).

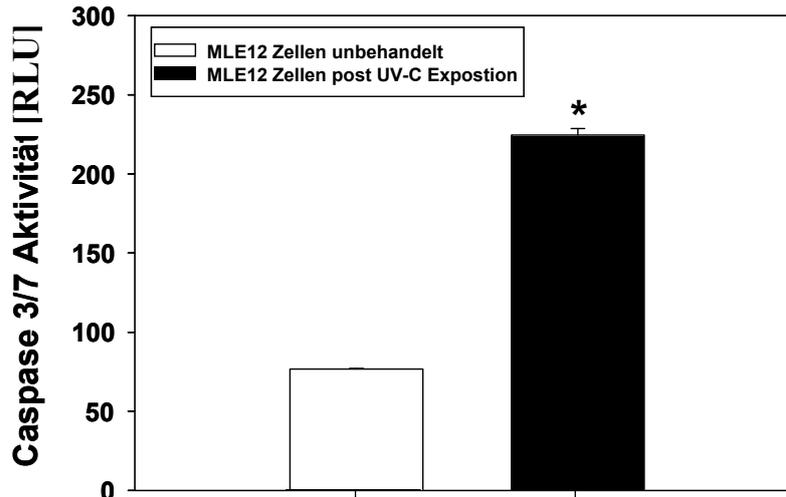


Abb. 4: Chemilumineszenz-Aktivität der Caspasen-3/7 von Maus-Lungen-Epithelzellen sechs Stunden nach UV-C (Ultraviolette Strahlung der Wellenlänge 200-280 nm)- Exposition, gemessen in Relativen Lichteinheiten [RLU]. $n=4$, one-way ANOVA, SNK, $*p<0,05$ vs. MLE12-Zellen unbehandelt. Mittelwert \pm SEM aus zwei unabhängigen, jeweils in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

3.2. Nekrose-Induktion an Maus-Lungen-Epithelzellen

Um in den nachfolgenden Instillationsstudien rein nekrotische von initial apoptotischen Effekten abgrenzen zu können, musste eine Methode gesucht werden, welche eine zuverlässige Induktion der Nekrose an sekundären Zellen (hier MLE12-Zellen) gewährleisten würde. Als geeignet wurde hierzu die Methode des physikalischen Aufbrechens der Zellen durch drei aufeinanderfolgende Gefrier/ Auftau-Zyklen betrachtet (siehe 2.5.1.) [74]. Wie in Abb. 5 gezeigt, wurden die MLE12-Zellen durch das Gefrier/Auftau-Verfahren nahezu vollständig (jeweils $> 85\%$) in nekrotisches Zellmaterial umgewandelt. Das nekrotische Zellmaterial der MLE12-Zellen wurde in den nachfolgenden Instillationsstudien als Kontrollgruppe zu den apoptotischen MLE12-Zellen verwendet.

3.3. Dosisfindung zur *in vivo* Applikation apoptotischer, nekrotischer und vitaler Maus-Lungen-Epithelzellen

Ziel der Experimente zur Dosisfindung war es, die maximale phagozytäre Kapazität der murinen Lunge zu ermitteln. Limitierender Faktor hierbei war das maximal in die Lunge zu applizierende Volumen von $100 \mu\text{l}$ sowie der verfügbare Pool an, vor allem apoptotischen, MLE12-Zellen (bzw. deren Suspensionskapazität in PBS). Die applizierte Zelldichte durfte dabei gerade so hoch sein, dass das resultierende Instillat eine Tracheagängige Konsistenz aufwies. Hierbei zeigte sich, dass eine Zellzahl von

1×10^8 Zellen/Instillat nicht überschritten werden sollte.

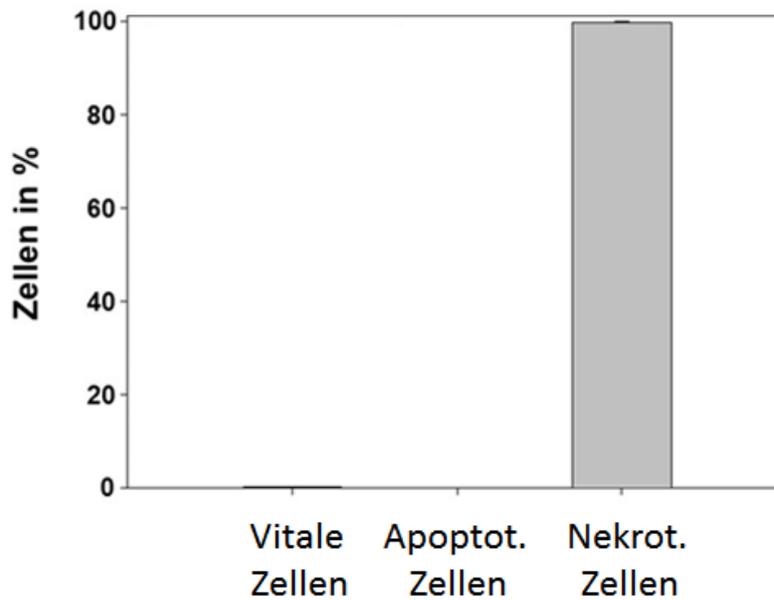


Abb. 5: Anteil an vitalen, apoptotischen (apoptot.) und nekrotischen (nekrot.) Maus-Lungen-Epithelzellen an der Gesamtzellzahl nach drei aufeinanderfolgenden Gefrier/Auftau-Zyklen. Zur Analyse wurden die Zellen mit dem AnnexinV/7-Aminoactinomycin D-Kit (Beckman Coulter; Brea, USA) gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. $n=3$. Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen, jeweils in Triplikaten durchgeführten Experimenten.

Um die Auslastung der Lunge nach Zell-Applikation *in vivo* zu untersuchen, wurden MLE12-Zellen zunächst mit dem grün fluoreszierenden Vitalfarbstoff 5-Chloromethylfluorescein Diazetat (CMFDA) angefärbt (näheres hierzu unter 2.5.6.). Die Instillation der Zellen erfolgte in die Lunge unbehandelter Kontrolltiere.

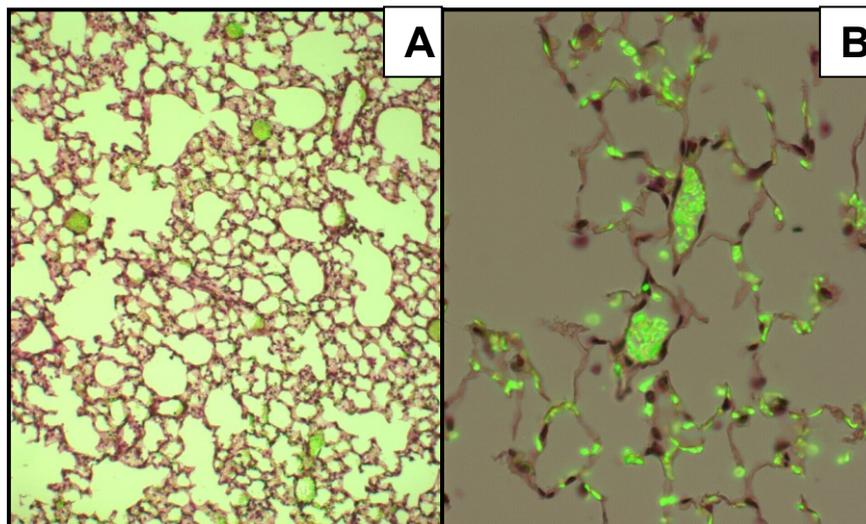


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Dünnschnitten der formalinfixierten und anschließend in Paraffin eingebetteten Lunge nativer C57BL/6-Mäuse nach Instillation von 1×10^7 vitalen 5-Chloromethylfluorescein Diazetat-markierten Maus-Lungen-Epithelzellen (A) 100x vergrößert. (B). 400x vergrößert. In den Alveolen sind zahlreiche grün fluoreszierende Maus-Lungen-Epithelzellen zu beobachten.

3.3.1. Versuche zur Überprüfung der maximalen Auslastung der murinen Lunge mit zellulärem Instillat

Es wurden zunächst 1×10^4 (nachfolgend auch als niedrige Zellzahl bezeichnet) oder 1×10^7 (nachfolgend auch als hohe Zellzahl bezeichnet) vitale, apoptotische und nekrotische MLE12-Zellen durch intratracheale Instillation pulmonal deponiert. Zur immunologischen Analyse des im Tierversuch gewonnenen Materials wurden sequentielle ELISAs am Lungengewebe durchgeführt. Das Probenmaterial wurde dazu jeweils 5 min (~ 0 h), 6 h und 24 h nach Instillation gewonnen und zur späteren Analyse bei -80°C konserviert (Tab. 1).

Tab. 1: Einteilung der Versuchstiere C57BL/6-Mäuse zur Untersuchung der Wirkung einer niedrigen oder hohen Konzentration an apoptotischen, nekrotischen (nekrot.) oder vitalen Maus-Lungen-Epithelzellen nach Instillation in native Tiere. Die Zeitpunkte der Probenentnahme sind 0, 6 und 24 Stunden (h) nach Instillation (post Instillation, p. I.). In der Kontrollgruppe wurde Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) instilliert.

Gruppe	Instillat	Analyse
Kontrollgruppe (sham)	PBS	0 h p. I.
Interventionsgruppe 1	1×10^7 vitale Zellen	0 h p. I.
Interventionsgruppe 2	1×10^4 apoptotische Zellen	0 h p. I.
Interventionsgruppe 3	1×10^4 nekrot. Zellmaterial	0 h p. I.
Interventionsgruppe 4	1×10^7 apoptotische Zellen	0 h p. I.
Interventionsgruppe 5	1×10^7 nekrot. Zellmaterial	0 h p. I.
Interventionsgruppe 6	1×10^4 apoptotische Zellen	6 h p. I.
Interventionsgruppe 7	1×10^4 nekrot. Zellmaterial	6 h p. I.
Interventionsgruppe 8	1×10^7 apoptotische Zellen	6 h p. I.
Interventionsgruppe 9	1×10^7 nekrot. Zellmaterial	6 h p. I.
Interventionsgruppe 10	1×10^4 apoptotische Zellen	24 h p. I.
Interventionsgruppe 11	1×10^4 nekrot. Zellmaterial	24 h p. I.
Interventionsgruppe 12	1×10^7 apoptotische Zellen	24 h p. I.
Interventionsgruppe 13	1×10^7 nekrot. Zellmaterial	24 h p. I.

3.3.1.1. Untersuchung der Zytokin-/Chemokinkonzentrationen in der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die IL-6-, IL-10- und KC-Konzentrationen in der BAL zeigten sich unmittelbar nach der

Instillation (0 h) von nekrotischem Zellmaterial in hoher Konzentration (1×10^7) signifikant gegenüber den Kontrollgruppen (PBS 0h und 1×10^7 vitale Zellen) erhöht (Abb. 7 A-C). IL-6 und KC-Konzentration zeigten sich darüber hinaus auch gegenüber der apoptotischen Gruppe (1×10^7) erhöht. Im weiteren zeitlichen Verlauf kam es für IL-6 und IL-10 zunehmend zu einer Angleichung des Zytokinspiegels in der BAL, während der Spiegel von KC nach 6 h maximal erhöht war. Dennoch war auch 6 h nach Instillation eine signifikante Erhöhung der IL-6-, IL-10 und KC-Spiegel in der BAL der Tiere, denen nekrotische Zellen (1×10^7) gegenüber den korrespondierenden Tieren denen apoptotische Zellen (1×10^7) appliziert wurden, zu beobachten.

Nach Instillation der apoptotischen Zellen wurde für IL-10 und KC unmittelbar nach Instillation (0 h) eine signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrollen beobachtet. Die Instillation von 1×10^7 vitalen MLE12-Zellen führte zu keiner Erhöhung der untersuchten Zytokine/Chemokine.

Wurde eine geringe Anzahl (1×10^4) an vitalen, apoptotischen oder nekrotischen Zellen appliziert, führte dies für IL-6 und KC nicht zu einer signifikanten Veränderung der Konzentrationen in der BAL (Abb. 7 E und G). Lediglich die Werte der IL-10-Konzentrationen waren zum 0 h-Zeitpunkt nach Instillation der Zellen, ungeachtet ihres jeweiligen Vitalitätsstatus, in der BAL (nicht signifikant) gegenüber der PBS-Kontrolle erhöht (Abb. 7 F).

Die Untersuchung des Gesamt-Protein-Gehalts der BAL zeigte unmittelbar nach Instillation einer hohen Anzahl vitaler und nekrotischer MLE12-Zellen eine leichte (nicht signifikante) Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe und Tieren nach Instillation apoptotischer Zellen (Abb. 7 D). 6 und 24 h nach Instillation zeigten sich die Protein-Level aller Gruppen auf Kontrollniveau. Nach Instillation einer geringen Zellzahl wurde für keine der Instillationen eine Veränderung der Proteinkonzentration in der BAL beobachtet (Abb. 7 H).

3.3.1.2. Untersuchung der Zytokin-/Chemokinkonzentrationen in der Lunge

Die Instillation einer hohen Anzahl von apoptotischen und nekrotischen Zellen (1×10^7) in die gesunde Lunge führte zum 6- und 24 h-Zeitpunkt zu einer tendenziellen Erhöhung der Spiegel von G-CSF (Abb. 8 A). Demgegenüber zeigten sich die Konzentrationen von IL-6 und IL-10 im Vergleich zu den Kontrollen unverändert (Abb. 8 B und C).

Die Zytokinspiegel in der Lunge der Tiere, denen eine geringe Anzahl apoptotischer oder nekrotischer Zellen instilliert wurde, zeigten sich für die untersuchten Zytokine (G-CSF, IL-6 und IL-10) gegenüber den Kontrollen unverändert (Abb. 8 D-F). Die Instillation von

1×10^7 und 1×10^4 vitalen Zellen führte gegenüber der PBS-Kontrollgruppe bezüglich der Konzentrationen von G-CSF und IL-6 zu keiner Erhöhung (Abb. 8 A, B, D und E).

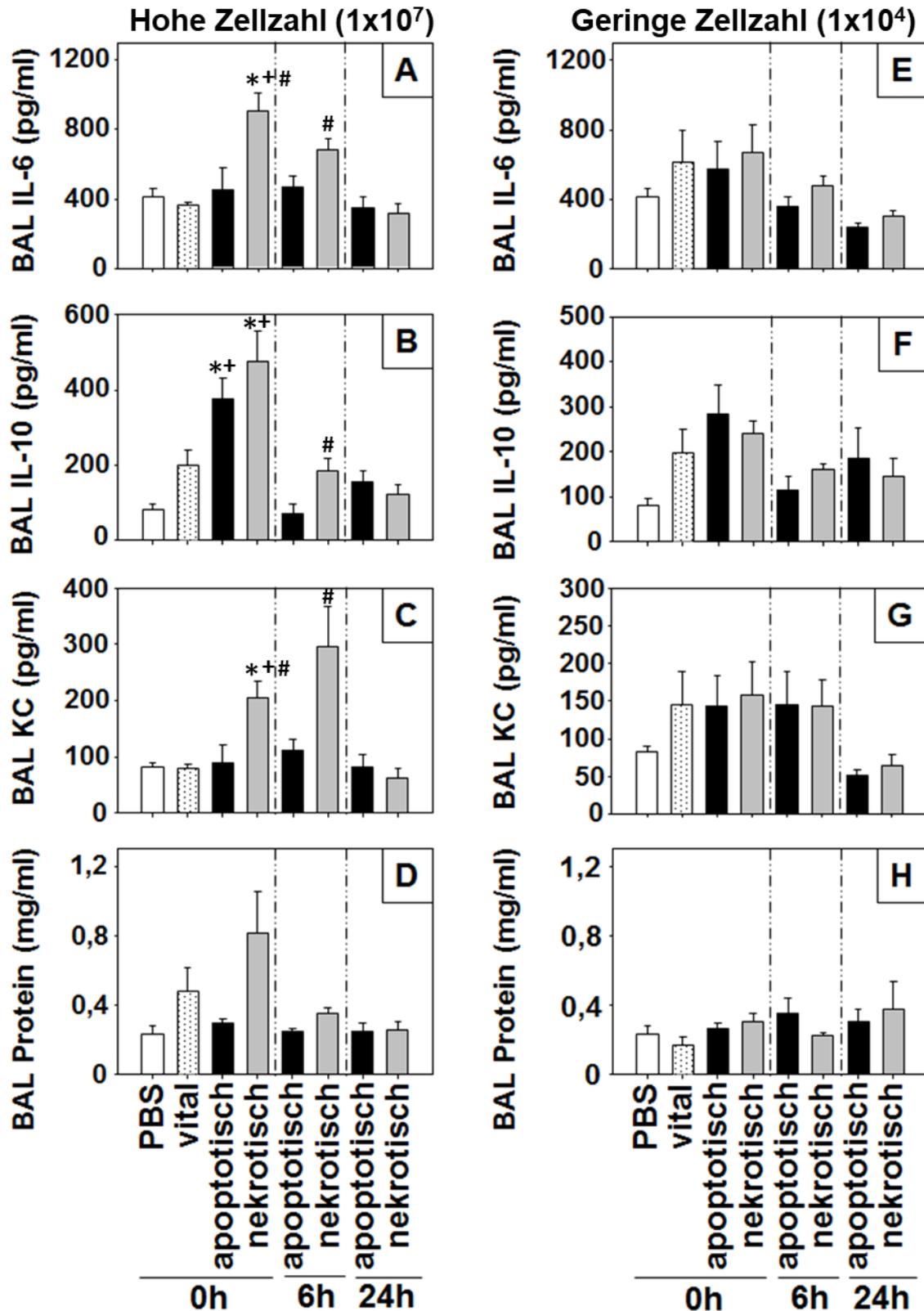


Abb. 7: Enzyme-linked immunosorbent assay zur Bestimmung der Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) und keratinocyte-derived chemokine (KC) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BAL) sowie die Analyse des Gesamtproteins in der dieser (BAL Protein) 0, 6 und 24h nach Injektion von 1×10^7 (links) oder 1×10^4 (rechts) vitalen Zellen. Die Konzentrationen sind in pg/ml (A, B, C, E, F, G) oder mg/ml (D, H) angegeben. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. * p < 0,05 gegenüber der PBS-Kontrollgruppe, # p < 0,05 gegenüber der vitalen Zellgruppe, + p < 0,05 gegenüber der apoptotischen Zellgruppe.

Fortsetzung von Abb. 7 auf Seite 43

Fortsetzung von Abb. 7

24 Stunden (h) nach Instillation von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), vitaler (vital), apoptotischer (apoptotisch) und nekrotischer (nekrotisch) Maus-Lungen-Epithelzellen in hoher Zellzahl (1×10^7 , A-D) und geringer Zellzahl (1×10^4 , E-H) in die Lunge un behandelter C57BL/6-Mäuse. (n=3-5/Gruppe). Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. *p<0,05 vs. PBS Kontrollgruppe, +p<0,05 vs. vital-Kontrollgruppe, #p<0,05 vs. korrespondierender Interventionsgruppe, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

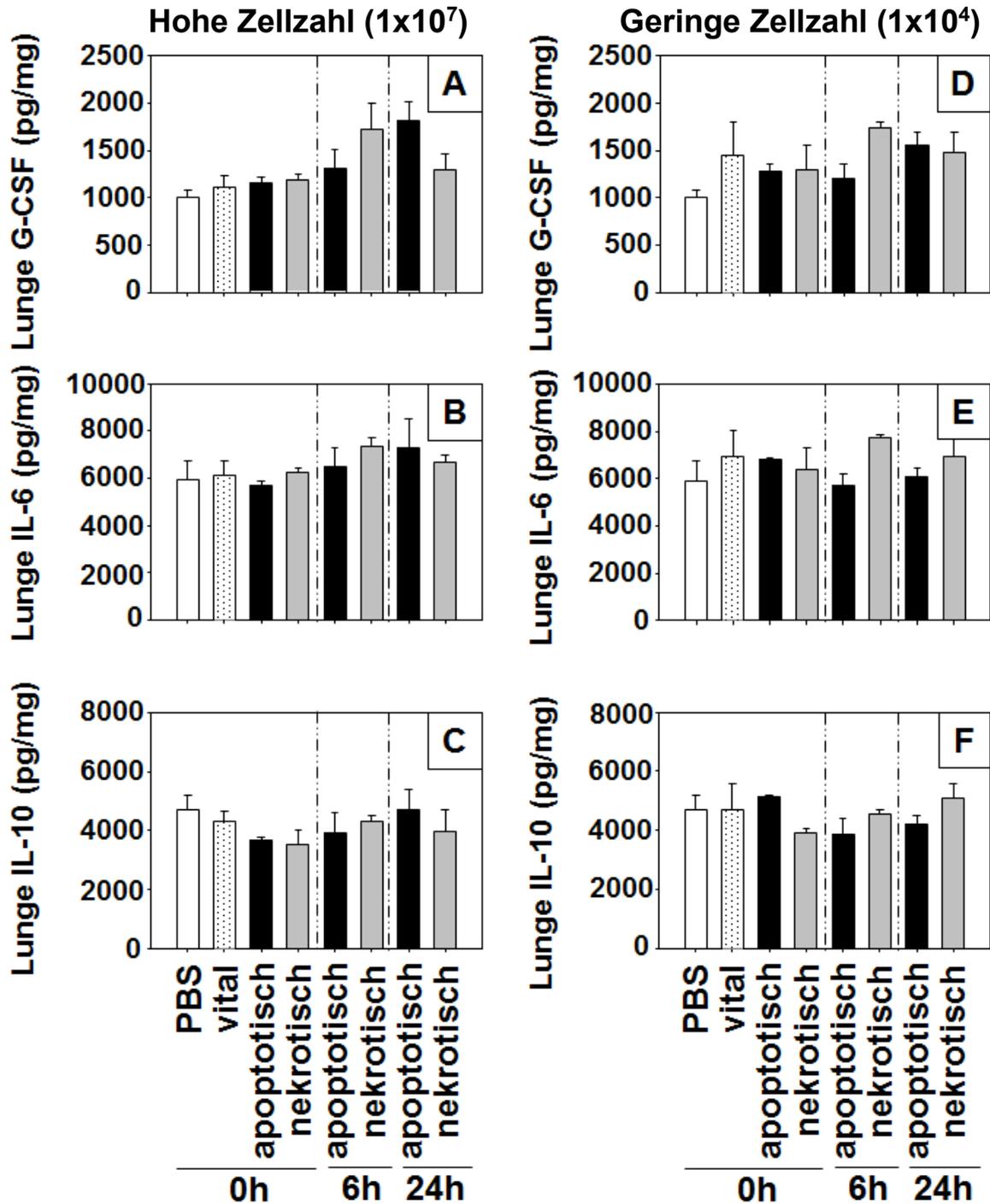


Abb. 8: Enzyme-linked immunosorbent assay zur Bestimmung der Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) und keratinocyte-derived chemokine (KC) in der Lunge 0, 6 und 24 Stunden (h) nach Instillation von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), vitaler (vital),

Fortsetzung von Abb. 8 auf Seite 44

Fortsetzung von Abb. 8

apoptotischer (apoptotisch) und nekrotischer (nekrotisch) Maus-Lungen-Epithelzellen in hoher Zellzahl (1×10^7 , A-C) und geringer Zellzahl (1×10^4 , D-F) in die Lunge unbehandelter C57BL/6-Mäuse. Messung der Extinktion bei 450 nm ($n=3-5$ /Gruppe). Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

3.3.1.3. Untersuchung der Zytokin-/Chemokinkonzentrationen im Plasma

Im Plasma der untersuchten Tiere wurde weder nach Instillation einer hohen noch einer niedrigen Anzahl von MLE12-Zellen eine Veränderung der Konzentrationen von IL-6, IL-10, KC oder MCP-1 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (PBS) beobachtet (ohne Abb.).

3.3.1.4. Myeloperoxidasen-Bestimmung

Die MPO-Aktivität in der Lunge der untersuchten Tiere zeigte sich in keiner der untersuchten Gruppen signifikant verändert (ohne Abb.).

3.3.1.5. Caspase-3 Westernblot an Lungenhomogenat

Zur Analyse der Apoptose-Aktivität nach Instillation einer geringen oder hohen Anzahl an apoptotischen, nekrotischen oder vitalen MLE12-Zellen *in vivo*, wurden Westernblot Analysen zur Quantifizierung des aktiven Fragments der (Effektor-) Caspase-3 in den Lungenhomogenaten der untersuchten Versuchstiere durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Menge an β -Aktin bestimmt.

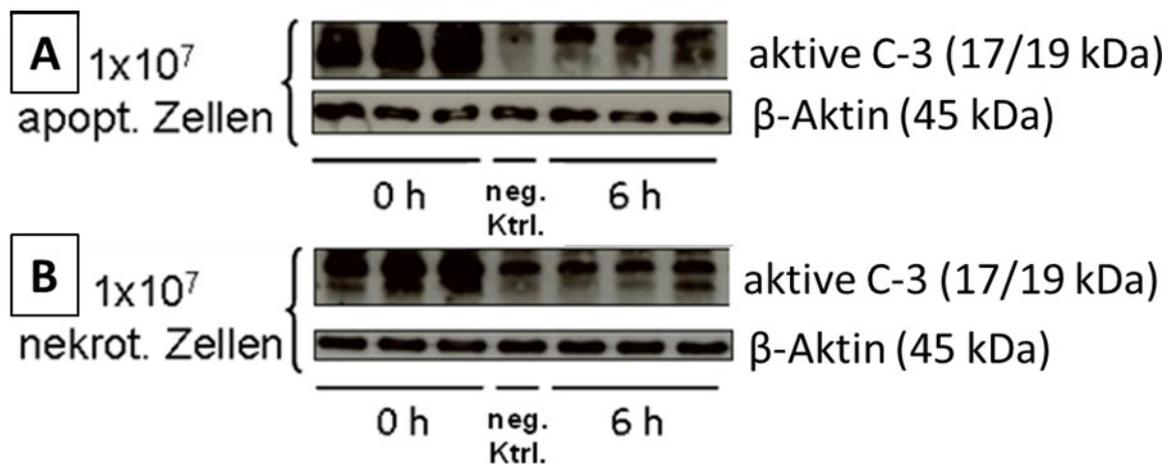


Abb. 9: Western Blot Analyse der Menge an aktiver Caspase-3 (cleaved Caspase-3 (Asp175); aktive C-3 (17/19 kDa)) im Lungenhomogenat der Versuchsgruppen nach Instillation von 1×10^7 apoptotischen (apopt.) (A) oder nekrotischen (nekrot.) Maus-Lungen-Epithelzellen Zellen (B) sowie Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) als Negativ-Kontrolle (neg. Ktrl.) zum 0-und 6-Stunden (h)-Zeitpunkt. Zur Normalisierung diente der korrespondierende β -Aktin Re-Blot (β -Aktin (45 kDa)). Gezeigt ist jeweils einer von zwei unabhängigen Blots.

Es zeigte sich unmittelbar nach Instillation (0 h) in der Lunge der Versuchstiere eine tendenzielle (nicht signifikante) Erhöhung der aktiven Caspase-3 sowohl für 1×10^7 apoptotische als auch nekrotische Zellen (Abb. 9 A/B). Diese Erhöhung war 6 h nach Instillation in verminderter Form auch noch in den Lungen der Tiere, denen eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen appliziert wurde, zu beobachten. Demgegenüber zeigte sich die Caspase-3 in der Lunge 6 h nach Instillation einer hohen Anzahl an nekrotischen MLE12-Zellen wieder auf Kontrollniveau. Die Instillation einer geringen Zellzahl (1×10^4) führte bei keinem der untersuchten Tiere zu einer Veränderung der Caspase-3 (ohne Abb.).

3.3.2. Instillation von Lungenhomogenat und einer sehr hohen Anzahl nekrotischer Maus-Lungen-Epithelzellen (1×10^8) zur Evaluation der maximalen pulmonalen Clearance-Kapazität

Es wurde untersucht, wie sich das Vorhandensein von nekrotischem Lungenmaterial in der gesunden Mauslunge auswirkt. Hierzu erfolgte die Homogenation von Lungen aus gesunden Tieren, die anschließend durch mehrmaliges Gefrieren und Auftauen zusätzlich physikalisch aufgebrochen und in die Lunge instilliert wurden. Es wurde auf diesem Weg, zunächst bei unbehandelten Tieren, die maximale phagozytäre bzw. *Clearance*-Kapazität der Lunge untersucht werden.

Im entsprechenden Tierversuch wurden die Homogenate in definierter Konzentration (10 mg/ 100 μ l) in einem Volumen von 100 μ l in die Lunge der gesunden C57BL/6-Maus instilliert. Parallel hierzu wurden darüber hinaus 1×10^8 nekrotische MLE12-Zellen in einer weiteren Gruppe von Tieren intratracheal appliziert. Hierbei handelte es sich um die zehnfache Menge an instillierten Zellen gegenüber dem vorangehend beschriebenen Versuch. Da die Instillation von 1×10^7 nekrotischen MLE12-Zellen eine allenfalls unmittelbare Veränderung der Zytokinspiegel der unbehandelten Maus induzierte, sollte hier, durch die Verwendung einer noch einmal erhöhten Menge an nekrotischem Zellmaterial, untersucht werden, ob damit die phagozytäre Kapazität überschritten und so eine persistierende inflammatorische Reaktion ausgelöst werden kann.

Das Protokoll für diesen Versuch gestaltete sich wie folgt: Zunächst wurde den Tieren (C57BL/6-Mäuse) Lungenhomogenat (10 mg/100 μ l), nekrotisches MLE12 Zellmaterial (1×10^8 Zellen) oder als Kontrolle PBS instilliert. Für die immunochemische Analyse (ELISA) im Anschluss an den Versuch wurde auch das reine Lungenhomogenat vor der Instillation (pr. Instillation) mitgeführt, um einen Vergleich der Interventionsgruppen zu ermöglichen (Tab. 2).

Tab. 2: Einteilung der Versuchstiere (C57BL/6-Mäuse) zur Untersuchung der Wirkung einer hohen Konzentration an nekrotischem Maus-Lungen-Epithelzellen (MLE) oder Lungenhomogenat nach Instillation in unbehandelte Tiere. Die Zeitpunkte der Probenentnahme sind 0, 2 und 6 Stunden (h) nach Instillation (post Instillation; p. I.). In der Kontrollgruppe wurde Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) instilliert. Als weitere Kontrolle wurde das reine Lungenhomogenat mitgeführt (prae Instillation, pr. I.)

Gruppe	Instillat	Analyse
Kontrollgruppe (sham)	PBS	6 h p. I.
Interventionsgruppe 1	Nekrotisches MLE12 Zellmaterial	6 h p. I.
Interventionsgruppe 2	Lungenhomogenat	0 h p. I.
Interventionsgruppe 3	Lungenhomogenat	2 h p. I.
Interventionsgruppe 4	Lungenhomogenat	6 h p. I.
Lungenhomogenat (pr. Inst.)	-	-

3.3.2.1. Untersuchung der lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge

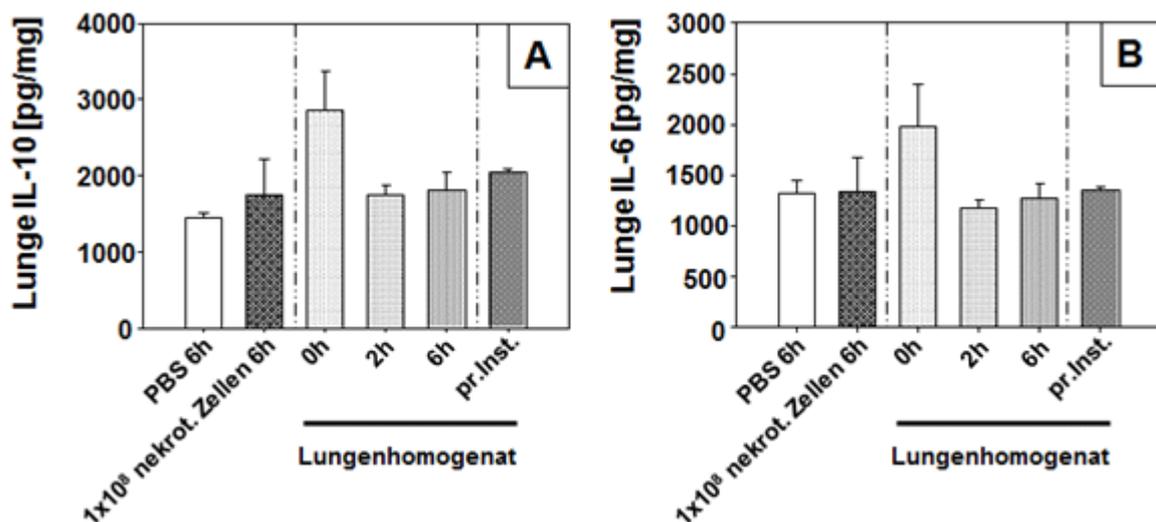


Abb. 10: Enzyme-linked immunosorbent assay zur Bestimmung der Konzentrationen von Interleukin-10 (IL-10) (A) und Interleukin-6 (IL-6) (B) in der Lunge 6 Stunden (6 h) nach Instillation von Phosphat-gepuffertes Salzlösung (PBS) und nekrotischen (nekrot.) Zellen (1×10^8) sowie 0, 2 und 6 Stunden (h) nach Instillation von Lungenhomogenat in die Lunge unbehandelter C57BL/6-Mäuse sowie im Lungenhomogenat vor Instillation (prae Instillation, pr. Inst). Messung der Extinktion bei 450 nm. ($n=4$ /Gruppe). Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

Für die IL-10- (Abb. 10 A) und IL-6-Konzentrationen (Abb. 10 B) in der Lunge zeigte sich unmittelbar nach Instillation (0 h ~ 5 min) von Lungenhomogenat eine (nicht signifikante)

Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollgruppen (PBS und 1×10^8 nekrotischen Zellen). Demgegenüber wurde für die Zeitpunkte 2 h und 6 h nach Instillation des Lungenhomogenats keine Veränderung für IL-6 und IL-10 in der Lunge gegenüber den Kontrollgruppen beobachtet. Zu keiner merklichen Veränderung führte die Instillation von nekrotischen Zellen oder Lungenhomogenat bei MCP-1 und KC (ohne Abb.).

3.3.2.2. Untersuchung der Zytokin-/Chemokinkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

IL-10 zeigte sich 5 min (0 h) nach Instillation des Lungenhomogenats gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) aber auch gegenüber den Tieren, die eine hohe Zellzahl (1×10^8) nekrotischer MLE12-Zellen erhalten hatten, in der BAL signifikant erhöht (Abb. 11 A).

Für die Zytokine MCP-1 und KC waren keine erhöhten Werte zu beobachten (ohne Abb.). Die Analyse des Gesamtproteins in der BAL zeigte für das Lungenhomogenat initial eine (nicht signifikante) Erhöhung nach 5 min (0 h), welche im zeitlichen Verlauf (über 2 h und 6 h) bis auf das Kontrolllevel abfiel (Abb. 11 B). Demgegenüber war für das Proteinlevel im reinen Lungenhomogenat und 6 h nach Instillation einer hohen Anzahl an nekrotischem Zellmaterial in der BAL eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) zu beobachten (Abb. 11 B).

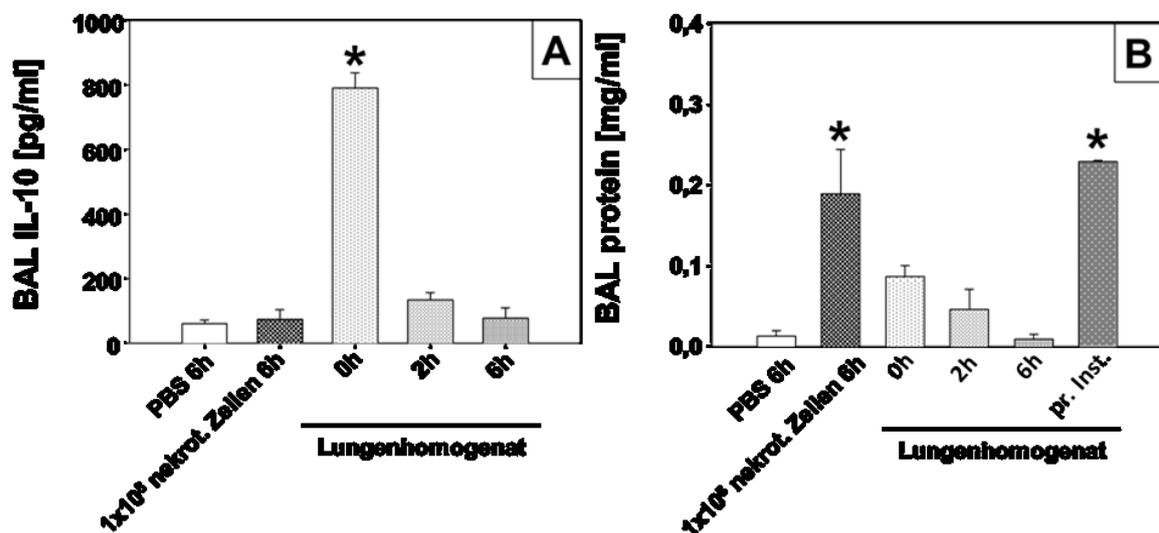


Abb. 11. Enzyme-linked immunosorbent assay der Konzentration von Interleukin-10 (IL-10) (A) sowie des Proteingehalts in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) (B) 6 Stunden (h) nach Instillation von Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) und nekrotischen (nekrot.) Zellen (1×10^8) sowie 0, 2 und 6 Stunden nach Instillation von Lungenhomogenat in die Lunge unbehauelter C57/BL6-Mäuse sowie im Lungenhomogenat vor Instillation (pr. Inst.). Messung der Extinktion bei 450 nm. ($n=4$ /Gruppe). Die Proteinbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption bei 562 nm. Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. * $p < 0,05$ vs. PBS Kontrollgruppe, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

3.4. Instillation von Lungenhomogenat in die akut geschädigte Lunge nach *double-hit* (6 h)

Nachdem an unbehandelten Tieren gezeigt wurde, dass die phagozytäre Kapazität jenseits von 1×10^8 instillierten Zellen liegt, wurde in einem weiteren Tierversuch die Wirkung von Lungenhomogenat in der vorgeschädigten Lunge bei Vorhandensein einer polymikrobiellen Sepsis untersucht. Hierzu wurde das etablierte Maus-Modell der traumainduzierten septischen ALI verwendet [127]. Dabei handelt es sich um ein Modell bestehend aus der Kombination eines stumpfen Thoraxtraumas (TxT) mit anschließender zökaler Ligatur und Punktion (CLP). Beide Interventionen werden nachstehend auch als *double-hit* bezeichnet (siehe 3.2.1.).

Hier wurde die Inflammationsreaktion nach intratrachealer Applikation von nekrotischem Lungenmaterial (Lungenhomogenat) 2 h nach zökaler Ligatur und Punktion und damit 26 h nach TxT, untersucht. Die Probenentnahme erfolgte entweder direkt (0 h) oder 6 h nach Instillation der Kontrollsubstanz (PBS) bzw. des Lungenhomogenats (Tab. 3).

Tab. 3: Einteilung der Versuchstiere zur Untersuchung der Wirkung von nekrotischem Lungenhomogenat nach Instillation in native Mäuse (Kontrollgruppen 1-4) und Tieren nach Thoraxtrauma (TxT) und zökaler Ligation und Punktion (CLP) (Interventionsgruppen 1-4). Die tracheale Applikation von Phosphat-gepuffertes Salzlösung (PBS) oder Lungenhomogenat (10 mg/100 μ l) erfolgte zwei Stunden nach CLP (appl. 2 h post CLP). Die Zeitpunkte der Probenentnahme waren 0 und 6 Stunden (h) nach Instillation (post Instillation, p. I.).

Gruppe	Intervention	Instillat (appl. 2 h post CLP)	Analyse
Kontrollgruppe 1	-	PBS	0 h p. I.
Kontrollgruppe 2	-	Lungenhomogenat	0 h p. I.
Interventionsgruppe 1	TxT + CLP	PBS	0 h p. I.
Interventionsgruppe 2	TxT + CLP	Lungenhomogenat	0 h p. I.
Kontrollgruppe 3	-	PBS	6 h p. I.
Kontrollgruppe 4	-	Lungenhomogenat	6 h p. I.
Interventionsgruppe 3	TxT + CLP	PBS	6 h p. I.
Interventionsgruppe 4	TxT + CLP	Lungenhomogenat	6 h p. I.

3.4.1. Untersuchung der systemischen Entzündungsreaktion

Die Applikation von Lungenhomogenat in die vorgeschädigte Lunge 2 h nach *double-hit*

fürte zu keiner signifikanten Erhöhung der KC-Konzentration im Plasma im Vergleich zu traumatisierten Kontrolltieren (Abb. 12 A). Im Vergleich zu den Kontrollgruppen (PBS und Lungenhomogenat) war 5 min nach Instillation (0 h) und auch 6 h später in den traumatisierten Tieren eine signifikante Erhöhung der KC-Konzentration im Plasma zu beobachten. G-CSF zeigte sich im Plasma 5 min nach der Instillation in traumatisierten Tieren (0 h) zunächst nicht signifikant verändert (Abb. 12 B). 6 h nach der Instillation waren in beiden Traumagruppen signifikante Erhöhungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen festzustellen.

Keine Unterschiede waren über alle Gruppen im Plasma für IL-10 vorhanden (ohne Abb.).

3.4.2. Untersuchungen der Zytokin-/Chemokinkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

KC zeigte sich in der BAL der traumatisierten Tiere 6 h nach Instillation von Lungenhomogenat signifikant gegenüber den Kontrollgruppen (PBS und DH + PBS) erhöht (Abb. 13 A). Unmittelbar nach Instillation war keine Erhöhung der KC-Konzentration in der BAL im Vergleich zur untraumatisierten Kontrollgruppe (PBS) zu beobachten. Die

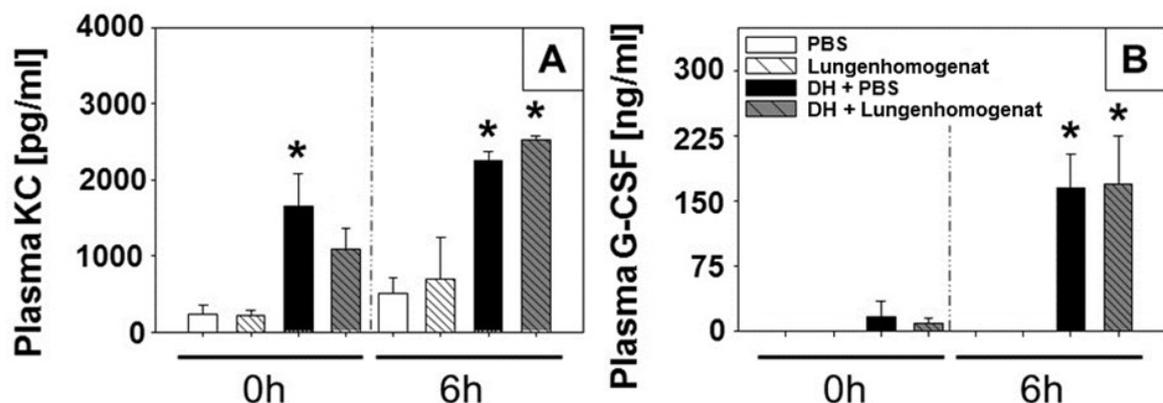


Abb. 12: Enzyme-linked immunosorbent assay zur Bestimmung der Konzentration von keratinocyte-derived chemokine (KC) (A) sowie granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (B) im Plasma 0 und 6 Stunden (h) nach intratrachealer Instillation von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) oder Lungenhomogenat in Kontrolltiere sowie in C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH) bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma und zökaler Ligation und Punktion (CLP). Die Applikation von PBS oder Lungenhomogenat erfolgte intratracheal 2 h nach CLP. Messung der Extinktion bei 450 nm. (n=4/Gruppe). Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. *p<0,05 vs. korrespondierender Kontrollgruppe, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert ± Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

Konzentrationen von IL-10 und IL-6 zeigten sich direkt nach Instillation sowohl in der BAL von untraumatisierten als auch in traumatisierten Tieren signifikant gegenüber den jeweiligen Kontrolltieren (PBS und DH + PBS) erhöht (Abb. 13 B/D). Demgegenüber zeigte

sich 6 h nach Instillation in der BAL von traumatisierten und nicht traumatisierten Kontrolltieren (PBS und DH + PBS) ein signifikant erhöhter Spiegel an TNF α (Abb. 13 C). In Tieren denen Lungenhomogenat appliziert wurde, zeigte sich die TNF α -Konzentration zum 0 h-Zeitpunkt nur gegenüber den untraumatisierten Tieren (PBS) signifikant erhöht. Insgesamt waren weder zum 0 h-Zeitpunkt noch zum 6 h-Zeitpunkt signifikante Erhöhungen der Konzentrationen von IL-6, IL-10, KC und TNF α im Vergleich von untraumatisierten (PBS) mit den traumatisierten Kontrolltieren (DH + PBS) zu beobachten. Hier war lediglich für KC eine Tendenz zu einem erhöhten Spiegel in der BAL 6 h nach Instillation von PBS in traumatisierte Tiere festzustellen (Abb. 13A).

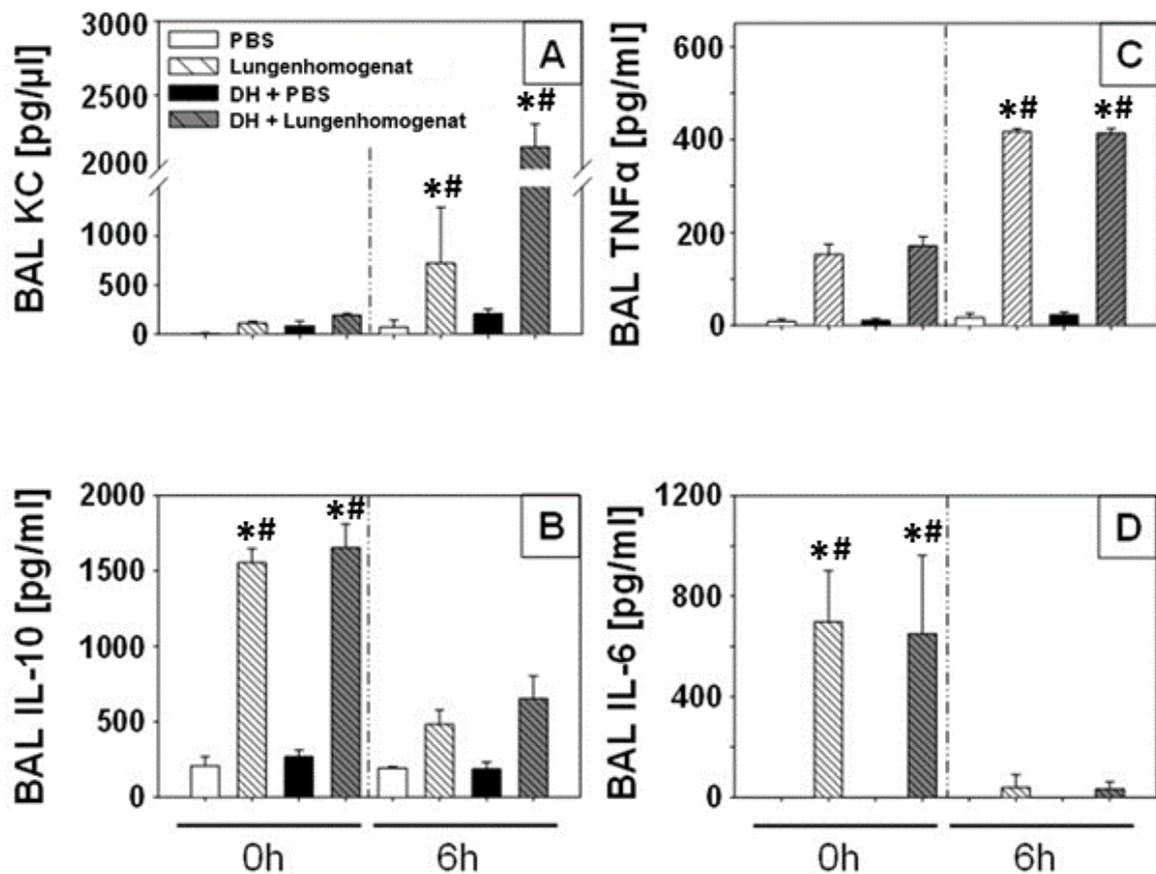


Abb. 13: Enzyme-linked immunosorbent assay zur Bestimmung der Konzentrationen von keratinocyte-derived chemokine (KC) (A), Interleukin-10 (IL-10) (B), Tumornekrose-Faktor α (TNF α) (C) und Interleukin-6 (IL-6) (D) in der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BAL) 0 und 6 Stunden (h) nach Instillation von Phosphat-gepuffertes Salzlösung (PBS) oder Lungenhomogenat in Kontrolltieren C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma und zökaler Ligation und Punktion. Die Applikation von PBS (DH+PBS) oder Lungenhomogenat (DH+Lungenhomogenat) erfolgte intratracheal 2 h nach CLP. Messung der Extinktion bei 450 nm. (n=4/Gruppe). Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. * $p < 0,05$ vs. korrespondierender PBS Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ vs. korrespondierender DH + PBS Gruppe, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

3.4.3. Untersuchung der lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge

Die Konzentration von MCP-1 (Abb. 14 A) zeigte sich in den traumatisierten Tieren 5 min (0 h) und 6 h nach Instillation von Lungenhomogenat oder PBS in traumatisierten Tieren signifikant gegenüber den nicht traumatisierten Kontrollgruppen (PBS und Lungenhomogenat bei 0 h und 6h sowie PBS nach 6 h) erhöht. 6 h nach Instillation zeigte sich, im Vergleich zum 0 h-Zeitpunkt eine weitere Erhöhung der MCP-1-Konzentrationen bei traumatisierten Tieren, denen Lungenhomogenat verabreicht worden war. Zum gleichen Zeitpunkt zeigte sich auch der MCP-1-Spiegel in den Lungen der nicht traumatisierten Tiere, die Lungenhomogenat verabreicht bekamen, gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) signifikant erhöht, während er gegenüber den traumatisierten Tieren (DH + PBS) unverändert blieb.

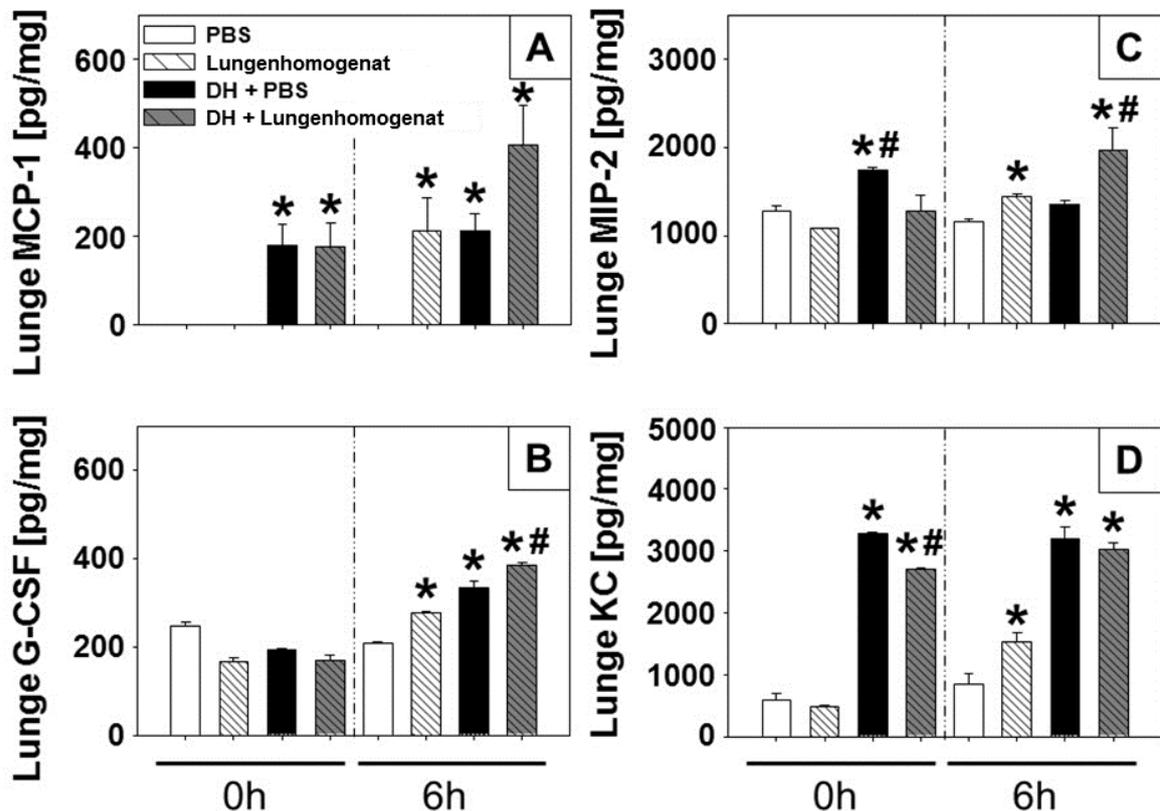


Abb. 14: Enzyme-linked immunosorbent assay der Konzentrationen von monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (A), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (B), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) (C) und keratinocyte-derived chemokine (KC) (D) in der Lunge 0 und 6 (h) Stunden nach Instillation von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) oder Lungenhomogenat in Kontrolltieren sowie in Tieren nach stumpfem Thoraxtrauma und zökalen Ligation und Punction (DH) behandelten C57/BL6-Mäusen, denen PBS (DH + PBS) oder Lungenhomogenat (DH + Lungenhomogenat) intratracheal 2 h nach CLP appliziert wurde. Messung der Extinktion bei 450 nm. (n=5-6/ Gruppe). Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. *p < 0,05 vs. korrespondierender PBS Kontrollgruppe, #p < 0,05 vs. korrespondierender DH + PBS Gruppe, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert ± Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

Für G-CSF (Abb. 14 B) war 6 h nach Intervention in allen untersuchten Gruppen eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) zu verzeichnen. Die Instillation des Lungenhomogenats führte darüber hinaus in den traumatisierten Tieren zu einer signifikanten Erhöhung des G-CSF Spiegels in der Lunge. Die Konzentration von MIP-2 (Abb. 14 C) zeigte 5 min (0 h) nach Instillation eine signifikante Erhöhung in den traumatisierten Tieren ohne Intervention (DH + PBS) gegenüber den nicht traumatisierten (PBS) aber auch gegenüber den traumatisierten Tieren, denen zuvor Lungenhomogenat instilliert worden war (DH + Lungenhomogenat). 6 h nach DH war die MIP-2-Konzentration der Tiere denen Lungenhomogenat appliziert wurde bezüglich ihrer MIP-2-Konzentration signifikant gegenüber der untraumatisierten Kontrollgruppe (PBS) und der traumatisierten Kontrollgruppe (DH + PBS) erhöht. In den nicht traumatisierten Tieren führte die Instillation von Lungenhomogenat nach 6 h zu einer signifikanten Erhöhung der MIP-2-Menge im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Die Konzentration von KC (Abb. 14 D) in den Lungen der traumatisierten Tiere zeigte sich sowohl nach der Instillation von Lungenhomogenat als auch in der Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) zum 0 h und zum 6 h-Zeitpunkt gleichermaßen signifikant gegenüber den Kontrollgruppen erhöht. Nach 5 min war die KC-Konzentration in traumatisierten Tieren ohne Lungenhomogenat zudem signifikant gegenüber der Gruppe mit Lungenhomogenat erhöht.

Auch die Instillation von Lungenhomogenat in die untraumatisierte Lunge führte zu einer leichten (signifikanten) Erhöhung des KC-Spiegels nach 6 h gegenüber der Kontrollgruppe (PBS). Die Spiegel von IL-1 β und TNF α sowie von Fas/FasL in den Lungen der untersuchten Tiere wiesen keinen nennenswerten Unterschied auf (ohne Abb.). Für IL-6 zeigte sich unmittelbar nach Instillation kein Unterschied in der Konzentration der untersuchten Lungen. Nach 6 h war jedoch ein signifikanter Anstieg der Konzentration von IL-6 in der Lunge bei traumatisierten Tieren mit Instillation von Lungenhomogenat gegenüber der traumatisierten Kontrollgruppe und den nicht traumatisierten Tieren zu beobachten. Auch die Instillation von Lungenhomogenat in die nicht traumatisierte Lunge zeigte zum 6 h-Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) (ohne Abb.).

3.4.4. Myeloperoxidase-Aktivität in der Lunge

Im Rahmen einer Analyse der MPO Aktivität konnten unabhängig von der jeweiligen Intervention keine Unterschiede zwischen den untersuchten Tieren beobachtet werden (ohne Abb.).

3.4.5. Zelldifferenzierung und Proteinbestimmung der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die Zelldifferenzierung der BAL-Zytospins (Abb. 15 A) zeigte eine signifikant erhöhte Infiltration von PMN in die native und die traumatisierte Lunge der Tiere die Lungenhomogenat erhalten hatten im Vergleich zu den traumatisierten und untraumatisierten Tieren welchen PBS instilliert wurde. Gegenüber der Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) zeigte sich 6 h nach Instillation auch eine leicht erhöhte aber nicht signifikante PMN-Anzahl in der Kontrollgruppe (PBS). Die Bestimmung der Gesamtzellzahl in der BAL zeigte insbesondere 6 h nach Instillation eine signifikant erhöhte Zellzahl in den traumatisierten Tieren, denen zuvor Lungenhomogenat verabreicht wurde, im Vergleich zu allen anderen Gruppen des untersuchten Zeitpunkts (ohne Abb.).

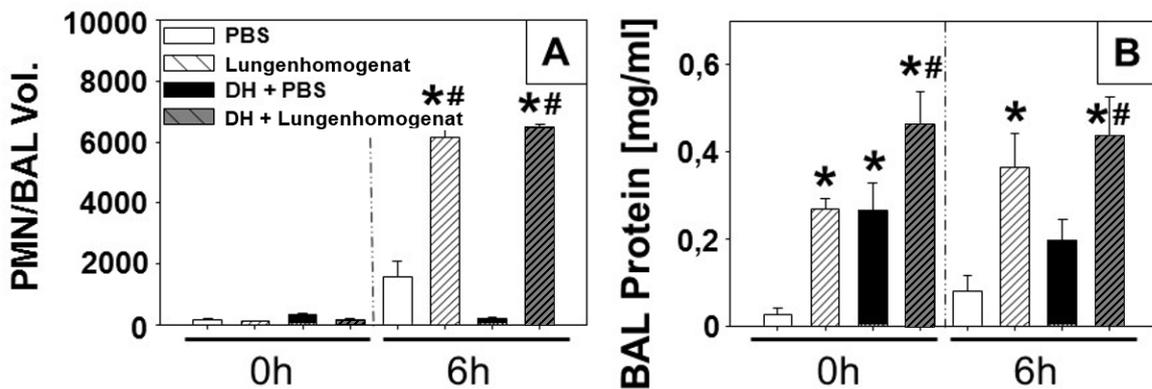


Abb. 15: Anzahl polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten in der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (PMN/BAL Vol.) (A) sowie der Proteingehalt (B) der Bronchoalveolären Lavage (BAL) 0 und 6 Stunden (h) nach intratrachealer Instillation von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) oder Lungenhomogenat in Kontrolltieren sowie C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma und zökaler Ligation und Punktion. Die Applikation von PBS oder Lungenhomogenat erfolgte 2 h nach zökaler Ligation und Punktion. Die Proteinbestimmung erfolgte mit Messung der Absorption bei 562 nm. Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. (n=4/Gruppe). *p<0,05 vs. PBS Kontrollgruppe, #p<0,05 vs. korrespondierender DH + PBS Gruppe, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert ± Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

Die Proteinkonzentration in der BAL (Abb. 15 B) zeigte sich unmittelbar nach Instillation in den traumatisierten Tieren mit und ohne Instillation von Lungenhomogenat signifikant erhöht gegenüber der Negativkontrolle (PBS, ohne Trauma). Die Instillation von Lungenhomogenat führte darüber hinaus in traumatisierten Tieren zu einer signifikant erhöhten Proteinmenge in der BAL im Vergleich zur Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) nach 0 h und 6 h. Des Weiteren zeigte sich die Proteinkonzentration in der BAL der untraumatisierten Tiere nach Instillation von Lungenhomogenat gegenüber der Negativkontrolle nach 0 h und 6 h erhöht. Das erhöhte Proteinlevel in der BAL der

traumatisierten Kontrolltiere (DH + PBS) zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle (PBS) nach 6 h lediglich tendenziell, nicht jedoch signifikant, erhöht.

3.5. Instillation von apoptotischen/nekrotischen Maus-Lungen-Epithelzellen oder Lungenhomogenat in die traumatisierte Mauslunge (12 h)

Um die inflammatorischen Effekte von apoptotischen/nekrotischen MLE12-Zellen bzw. Lungenhomogenat in der traumatisierten (TxT + CLP) Lunge der Maus zu analysieren, wurden C57BL/6-Mäuse 12 h nach intratrachealer Instillation untersucht.

Wie in Tab. 4 aufgeführt, erfolgte die Instillation der apoptotischen oder nekrotischen MLE12-Zellen oder des Lungenhomogenats unmittelbar im Anschluss an die CLP-Prozedur. Der 12 h-Zeitpunkt zur Erhebung der Daten wurde gewählt, da in vorangehenden Studien [111],[127] gezeigt wurde, dass es hier zu einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion in Folge des *double-hit* kommt.

Tab. 4: Einteilung der Versuchstiere zur Untersuchung der Wirkung einer hohen Anzahl von apoptotischen oder nekrotischen Maus-Lungen-Epithelzellen sowie von nekrotischem Lungenhomogenat (10 mg/ 100 µl) nach Instillation in unbehandelte Tiere (Kontrollgruppen 1-4) und Tiere mit Thoraxtrauma (TxT) und zökaler Ligation und Punktion (CLP) (Interventionsgruppen 1-4). Die tracheale Applikation erfolgte unmittelbar nach CLP (appl. nach CLP). Die Probenentnahme erfolgte 12 Stunden (h) nach Instillation (post Instillation, p. I.). Als Kontrolle wurde jeweils Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) verwendet.

Gruppe	Intervention	Instillat (appl. nach CLP)	Analyse
Kontrollgruppe 1	-	PBS	12 h p. I.
Interventionsgruppe 1	TxT + CLP	PBS	12 h p. I.
Kontrollgruppe 2	-	1x10 ⁷ apoptotische Zellen	12 h p. I.
Interventionsgruppe 2	TxT + CLP	1x10 ⁷ apoptotische Zellen	12 h p. I.
Kontrollgruppe 3	-	1x10 ⁷ nekrotische Zellen	12 h p. I.
Interventionsgruppe 3	TxT + CLP	1x10 ⁷ nekrotische Zellen	12 h p. I.
Kontrollgruppe 4	-	Lungenhomogenat	12 h p. I.
Interventionsgruppe 4	TxT + CLP	Lungenhomogenat	12 h p. I.

3.5.1. Untersuchungen der lokalen Entzündungsantwort in der Lunge

Für die Konzentration von KC wurde in der Lunge der traumatisierten Tiere eine signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrolltieren zum untersuchten Zeitpunkt (12 h) beobachtet

(Abb. 16 A). Darüber hinaus zeigte sich die Menge an KC in traumatisierten Tieren nach Instillation von apoptotischen MLE12-Zellen (1×10^7) signifikant vermindert gegenüber den Trauma-Kontrolltieren (DH + PBS).

Eine vergleichbare Tendenz, jedoch ohne Signifikanz, war auch in traumatisierten Tieren nach Instillation von nekrotischen MLE12-Zellen (1×10^7) oder Lungenhomogenat zu finden. Die Untersuchung der G-CSF-Konzentration in der Lunge zeigte erhöhte Werte bei den untraumatisierten Kontrolltieren (PBS), so dass für die Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) nur eine tendenzielle Erhöhung des G-CSF-Spiegels in der Lunge gegenüber der untraumatisierten Kontrolle (PBS) festzustellen war (Abb. 16 B).

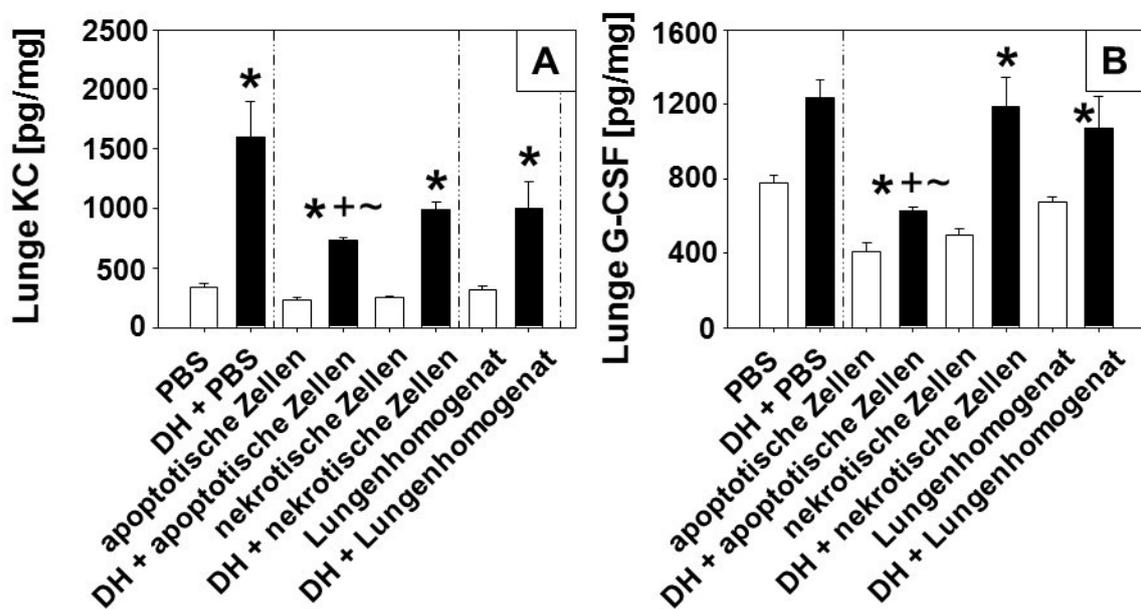


Abb. 16: Enzyme-linked immunosorbent assay zur Bestimmung der Konzentrationen von keratinocyte-derived chemokine (KC) (A) und granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (B) in der Lunge 12 Stunden nach Instillation von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), apoptotischen oder nekrotischen Maus-Lungen-Epithelzellen (je 1×10^7) und Lungenhomogenat in Kontrolltieren sowie C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma und zökaler Ligation und Punktion. Messung der Extinktion bei 450 nm. ($n=5-6$ / Gruppe). Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. * $p < 0,05$ vs. korrespondierende untraumatisierte Kontrollgruppe, + $p < 0,05$ vs. DH + PBS, ~ $p < 0,05$ vs. DH + nekrotische Zellen, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

Signifikant erhöhte G-CSF-Konzentrationen gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen waren in den anderen Interventionsgruppen zu beobachten. Die Instillation von apoptotischen Zellen nach Trauma führte zu signifikant reduzierten G-CSF- und KC-Spiegeln im Vergleich zu den Tieren, denen PBS oder nekrotische Zellen nach Trauma instilliert worden waren.

3.5.2. Untersuchungen der systemischen Entzündungsreaktion

Die Mengen an G-CSF und TNF α zeigten sich im Plasma in allen traumatisierten Tieren im Vergleich zu den untraumatisierten Kontrollen, unabhängig von der jeweiligen Intervention, signifikant erhöht (Abb. 17 A/C). Unter den traumatisierten Tieren zeigten sich darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede in den beobachteten G-CSF- und TNF α -Konzentrationen.

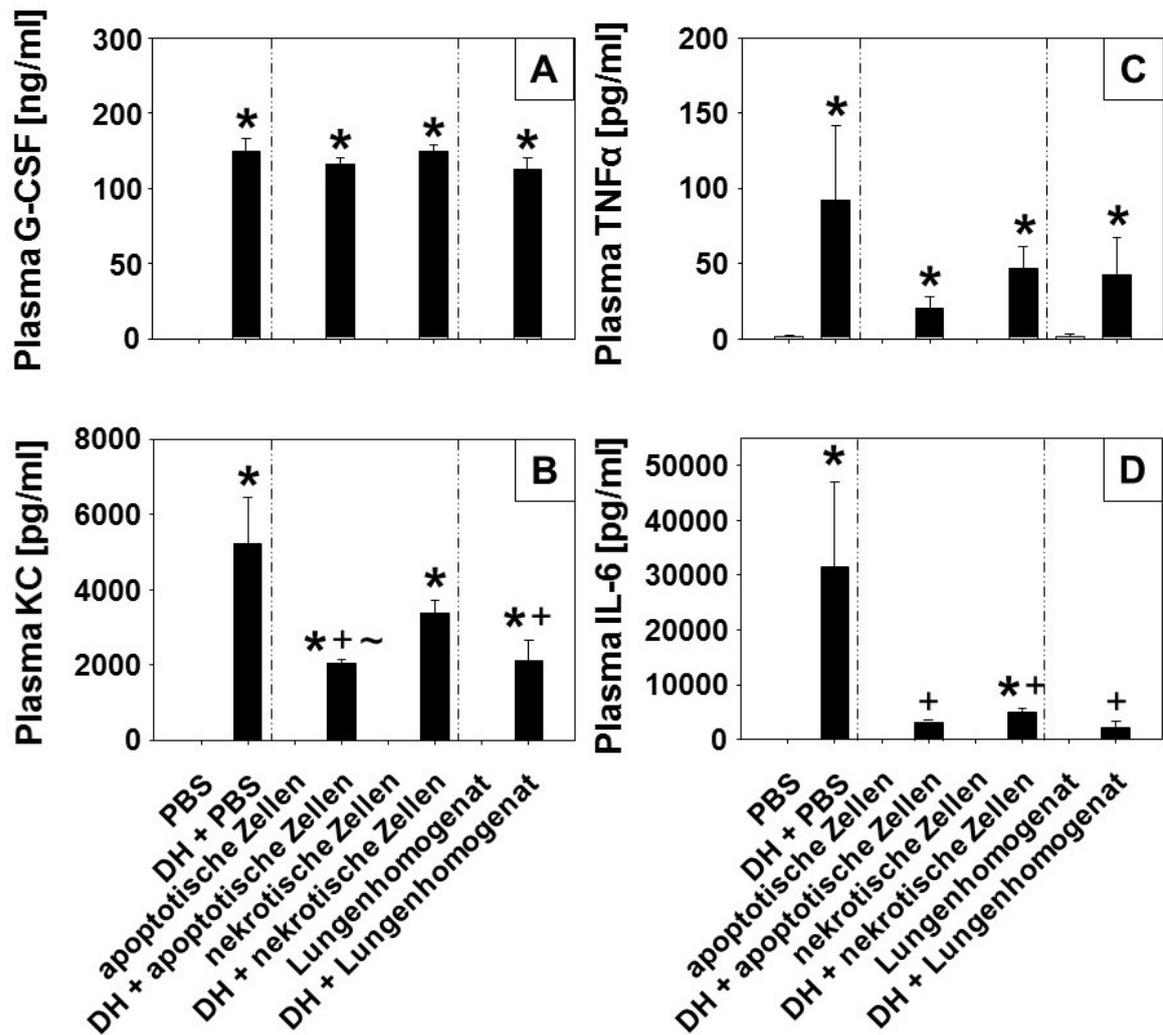


Abb. 17: Enzyme-linked immunosorbent assay zur Bestimmung der Konzentrationen von granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (A), keratinocyte-derived chemokine (KC) (B), Tumor-nekrosefaktor- α (TNF α) (C) und Interleukin-6 (IL-6) (D) im Plasma 12 Stunden nach Instillation von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), apoptotischen, nekrotischen Maus-Lungen-Epithelzellen (je 1×10^7) oder Lungenhomogenat in Kontrolltieren sowie C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma und zökaler Ligation und Punktion (CLP) (Zeitpunkt der Instillation unmittelbar nach CLP). Messung der Extinktion bei 450 nm. (n=4/Gruppe). Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. * $p < 0,05$ vs. korrespondierender Kontrollgruppe, + $p < 0,05$ vs. DH + PBS, ~ $p < 0,05$ vs. DH + nekrotische Zellen, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

Alle traumatisierten Tiere wiesen, unabhängig von der Intervention, im Vergleich zu den untraumatisierten Kontrollen signifikant erhöhte Mengen an KC im Plasma auf (Abb. 17 B). Die Instillation von apoptotischen MLE12-Zellen führte außerdem zu einem signifikant verringerten KC-Spiegel im Plasma im Vergleich zur Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) und den Tieren, denen nekrotische Zellen nach Trauma appliziert worden waren (DH + nekrotische Zellen). Nach Instillation apoptotischer und nekrotischer MLE12-Zellen sowie des Lungenhomogenats waren im Vergleich zur Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) signifikant erniedrigte IL-6-Level zu beobachten (Abb. 17 D). Darüber hinaus zeigten sich die IL-6-Konzentrationen in der Trauma-Kontrollgruppe (PBS) und nach Instillation von nekrotischen MLE12-Zellen post Trauma signifikant gegenüber den untraumatisierten Kontrollen erhöht.

3.5.3. Untersuchung der Zytokin-/Chemokinkonzentration in der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die Konzentration von G-CSF in der BAL 12 h nach Trauma zeigte sich in allen traumatisierten Tieren im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren (ohne Trauma), unabhängig von der Intervention, signifikant erhöht. Dabei war eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante, Reduktion der G-CSF-Spiegel nach Instillation von apoptotischen und nekrotischen MLE12-Zellen sowie von Lungenhomogenat zu beobachten (Abb. 18 A).

Für die IL-10-Spiegel in den traumatisierten Tieren, mit Ausnahme der Tiere, denen Lungenhomogenat verabreicht worden war, konnte eine signifikante Reduktion in der BAL im Vergleich zu den jeweiligen untraumatisierten Kontrolltieren festzustellen (Abb. 18 B). Des Weiteren zeigten sich die IL-10-Spiegel in der BAL nach MLE12-Zellinstillation (apoptotisch oder nekrotisch) und auch in der PBS-Kontrollgruppe (DH + PBS) signifikant im Vergleich zu den Tieren nach Trauma und Instillation von Lungenhomogenat erniedrigt. Aufgrund der erhöhten Spiegel in den Kontrolltieren (ohne Trauma) waren die KC-Konzentrationen ohne signifikante Unterschiede nach Instillation von nekrotischen MLE12-Zellen oder Lungenhomogenat nach Trauma (Abb. 18 C).

Stattdessen zeigten sich die KC-Konzentrationen in den untraumatisierten Tieren nach Instillation von MLE12-Zellen und Lungenhomogenat signifikant erhöht gegenüber der Negativkontrolle (PBS). Die Untersuchung der IL-6-Konzentrationen in der BAL 12 h nach Trauma ergab, dass lediglich die Werte der Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (PBS) signifikant erhöht waren (Abb. 18 D).

Durch die erhöhten IL-6-Spiegel in den untraumatisierten Kontrollgruppen (signifikant

gegenüber der Negativ-Kontrolle (PBS)), war keine signifikante Erhöhung in der BAL der Tiere nach Trauma und Instillation von MLE12-Zellen oder Lungenhomogenat festzustellen.

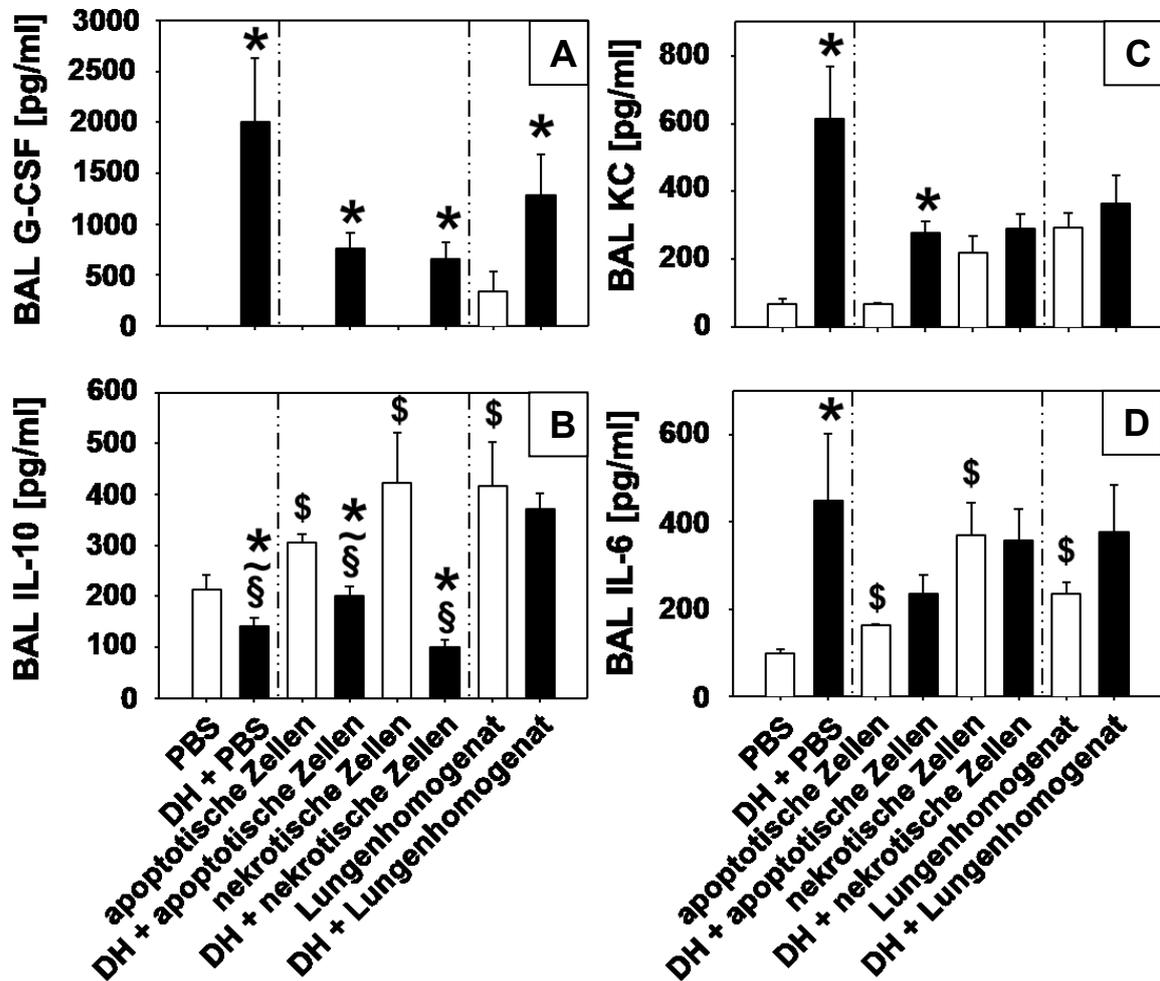


Abb. 18: Enzyme-linked immunosorbent assay zur Bestimmung der Konzentrationen von granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (A), Interleukin-10 (IL-10) (B), keratinocyte-derived chemokine (KC) (C) und Interleukin-6 (IL-6) (D) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BAL) 12 Stunden nach Instillation von Phosphat-gepuffertes Salzlösung (PBS), apoptotischen, nekrotischen Maus-Lungen-Epithelzellen (je 1×10^7) oder Lungenhomogenat in Kontrolltieren sowie C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma sowie zökaler Ligation und Punktion (CLP) (Zeitpunkt der Instillation unmittelbar nach CLP). Messung der Extinktion bei 450 nm. ($n=4$ /Gruppe). Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. * $p < 0,05$ vs. korrespondierender Kontrollgruppe, ~ $p < 0,05$ vs. DH + nekrotische Zellen, § $p < 0,05$ vs. DH + Lungenhomogenat, \$ $p < 0,05$ vs. PBS Kontrollgruppe, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

Analog zu den in der Lunge beobachteten Zytokin-Konzentrationen zeigte sich auch in der BAL für G-CSF in allen traumatisierten Tieren im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollen eine signifikante Erhöhung. Ebenfalls war hier eine signifikante Reduktion des G-CSF-Spiegels nach Instillation von apoptotischen Zellen in traumatisierten Tieren zu

beobachten. Vergleichbares war für IL-6 und KC, hier jedoch ohne Signifikanz, zu verzeichnen. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für IL-10 in der BAL nach Trauma eine merkliche Reduktion im Vergleich zu den nicht traumatisierten Kontrolltieren. Dabei erreichte diese Reduktion nach Instillation nekrotischer MLE12-Zellen gegenüber der Kontrollgruppe (nekrotische Zellen) aber auch gegenüber den anderen Trauma- und Kontrollgruppen Signifikanz. Die Konzentration von TNF α in der BAL zeigte sich in den PBS-Gruppen konstant niedrig, wohingegen die Instillation von apoptotischen und nekrotischen MLE12-Zellen zu einer merklichen (nicht signifikanten) Erhöhung führte.

3.5.4. Untersuchung der Zellzahl und des Proteingehalts der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

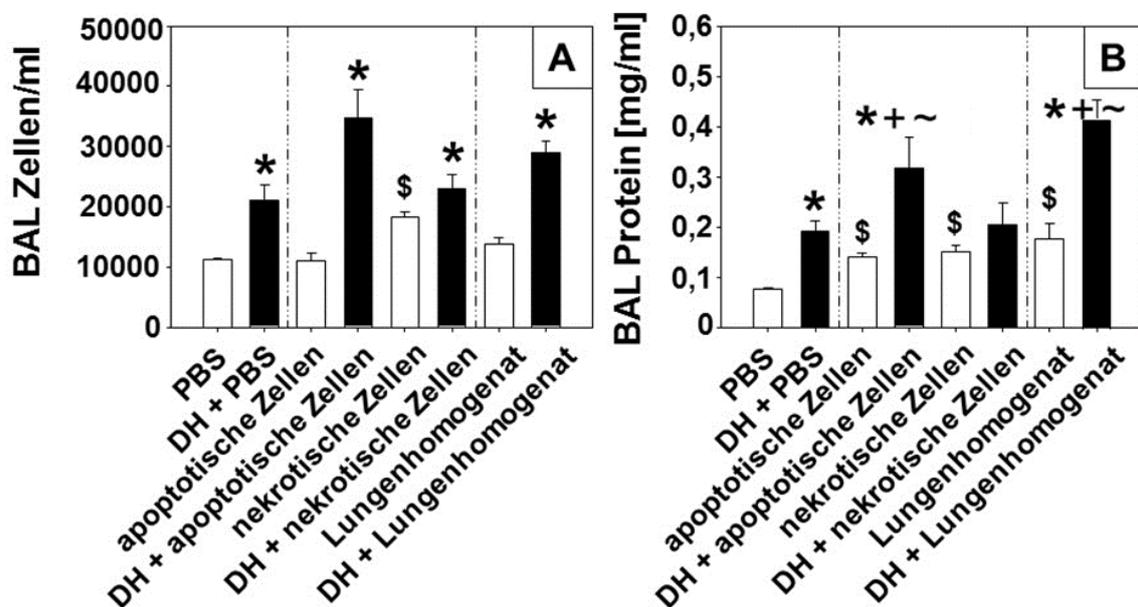


Abb. 19: Gesamtzellzahl und Proteingehalt in der bronchoalveolären Lavage (BAL) 12 Stunden nach Instillation von Phosphat-gepuffertes Salzlösung (PBS), apoptotischen oder nekrotischen Mausepithelzellen (1×10^7) oder Lungenhomogenat in Kontrolltieren sowie C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma und zökaler Ligation und Punction (CLP) (Zeitpunkt der Instillation unmittelbar nach CLP). Die Proteinbestimmung erfolgte mit Messung der Absorption bei 562 nm. Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. ($n=4$ /Gruppe). * $p < 0,05$ vs. korrespondierender Kontrollgruppe, + $p < 0,05$ vs. DH + PBS, ~ $p < 0,05$ vs. DH + nekrotische Zellen, \$ $p < 0,05$ vs. PBS Kontrollgruppe, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl in der BAL waren in allen untersuchten Trauma-Gruppen unabhängig von der jeweiligen Intervention signifikant erhöhte Zellzahlen im Vergleich zu den jeweiligen nichttraumatisierten Gruppen festzustellen (Abb. 9 A). Tiere, denen post Trauma apoptotische Zellen instilliert worden waren, zeigten darüber hinaus tendenziell erhöhte BAL-Zellzahlen gegenüber allen anderen traumatisierten Tieren. Die

Zellzahlen in der BAL der Kontrollgruppe, welcher einer Instillation nekrotischer Zellen (1×10^7) nach Trauma unterzogen wurde, waren signifikant erhöht gegenüber der PBS-Kontrollgruppe ohne Trauma (PBS). Dagegen konnte für alle anderen Kontrollgruppen keine Erhöhung beobachtet werden.

Die Analysen zum Gesamtprotein in der BAL zeigten signifikant erhöhte Werte in allen traumatisierten Tieren gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen (ausgenommen DH + nekrotische Zellen) (Abb. 19 B). Diese Erhöhung zeigte sich insbesondere für Tiere, denen nach Trauma Lungenhomogenat oder apoptotische Zellen (1×10^7) instilliert worden waren. So waren die vorbenannten Protein-Level auch gegenüber der Traumakontrollgruppe (DH + PBS) und den Tieren, die nekrotische Zellen (1×10^7) post Trauma appliziert bekommen hatten, erhöht. In den untraumatisierten Tieren führte die Instillation nekrotischer und apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenso zu einer signifikanten Erhöhung des BAL-Proteins, wie es nach Instillation von Lungenhomogenat zu beobachten war. Die Instillation nekrotischer Zellen (1×10^7) zeigte als einzige untersuchte korrespondierende Gruppe keinen signifikanten Effekt zwischen traumatisierten und untraumatisierten Tieren.

3.5.5. Caspase-3 Westernblot von Lungenhomogenat

Um zu untersuchen, inwiefern die Instillation einer hohen Anzahl an apoptotischen oder nekrotischen MLE12-Zellen bzw. von Lungenhomogenat ($10 \text{ mg}/100 \mu\text{l}$) zu einer Veränderung der Menge an Aktiver Caspase-3 in der Lunge der Versuchstiere führt, wurde eine Westernblot Analyse durchgeführt.

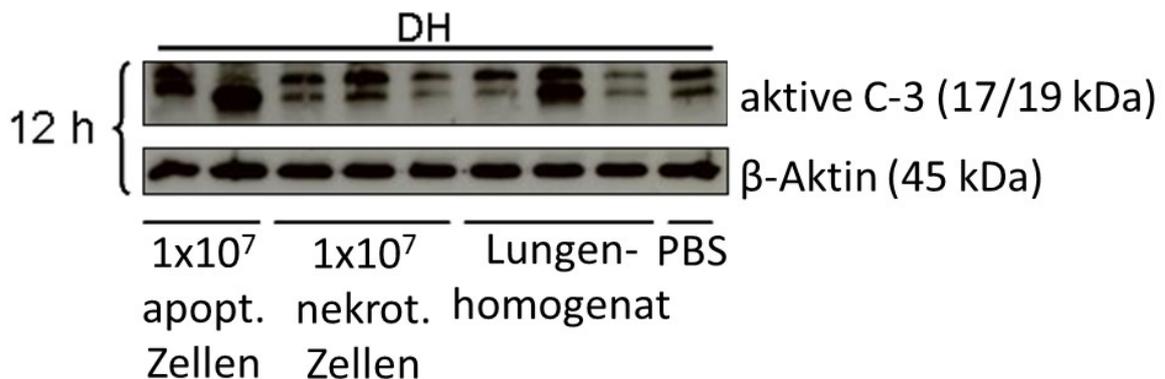


Abb. 20: Repräsentative Westernblot Analyse zur Quantifikation der aktiven Caspase-3 (Cleaved Caspase-3 (Asp175); aktive C-3 (17/19 kDa)) im Lungenhomogenat von nativen Tieren, 12 Stunden (12 h) nach Instillation von 1×10^7 apoptotischen (apopt.) bzw. nekrotischen (nekrot.) Maus-Lungen-Epithelzellen oder Lungenhomogenat ($10 \text{ mg}/100 \mu\text{l}$) sowie Phosphat-gepufferte Salzlösung als Kontrolle (PBS). Zur Normalisierung diente der korrespondierende β -Aktin Re-Blot (β -Aktin (45 kDa)) Gezeigt ist einer von zwei unabhängigen Blots.

Dabei zeigte sich in den Tieren, denen eine hohe Anzahl an apoptotischen Zellen instilliert worden war, eine leicht erhöhte Menge an Aktiver Caspase-3 im Vergleich zu allen anderen untersuchten Gruppen (Abb. 20). Die Instillation von nekrotischen Zellen oder Lungenhomogenat führte dagegen nicht zu einer Erhöhung der Caspase-3-Mengen in der Lunge im Vergleich zur Kontrollgruppe (DH + PBS).

3.6. Instillation einer geringen oder hohen Anzahl apoptotischer/nekrotischer MLE12-Zellen in einem therapeutischen Ansatz im Rahmen des ALI-Mausmodells

In einer abschließenden Studie wurde das therapeutische Potential apoptotischer MLE12-Zellen und im Vergleich hierzu auch von nekrotischen Zellmaterial im Maus-Modell der akuten septischen Lungenschädigung untersucht. Hierzu wurden die Tiere (C57BL/6-Mäuse) in folgende Gruppen eingeteilt:

Tab. 5: Einteilung der Versuchstiere zur Untersuchung der Wirkung einer hohen bzw. niedrigen Anzahl von apoptotischen oder nekrotischen Maus-Lungen-Epithelzellen nach Instillation in unbehandelte Tiere (Kontrollgruppen 1-5) und Tiere nach Thoraxtrauma (TxT) und zökaler Ligation und Punction (CLP) (Interventionsgruppen 1-5). Die Instillation wurde vier Stunden nach TxT durchgeführt (appl. 4 h nach TxT). Die Probenentnahme erfolgte 12 Stunden (h) nach CLP (p. CLP). Als Kontrolle wurde jeweils Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) verwendet.

Gruppe	Intervention	Instillat (appl. 4 h nach TxT)	Analyse
Kontrollgruppe 1	-	PBS	12 h p. CLP
Kontrollgruppe 2	-	1x10 ⁷ apoptotische Zellen	12 h p. CLP
Kontrollgruppe 3	-	1x10 ⁷ nekrotische Zellen	12 h p. CLP
Kontrollgruppe 4	-	1x10 ⁴ apoptotische Zellen	12 h p. CLP
Kontrollgruppe 5	-	1x10 ⁴ nekrotische Zellen	12 h p. CLP
Interventionsgruppe 1	TxT + CLP	PBS	12 h p. CLP
Interventionsgruppe 2	TxT + CLP	1x10 ⁷ apoptotische Zellen	12 h p. CLP
Interventionsgruppe 3	TxT + CLP	1x10 ⁷ nekrotische Zellen	12 h p. CLP
Interventionsgruppe 4	TxT + CLP	10 ⁴ apoptotische Zellen	12 h p. CLP
Interventionsgruppe 5	TxT + CLP	10 ⁴ nekrotische Zellen	12 h p. CLP

3.6.1. Untersuchung der pulmonalen Infiltration polymorphkerniger mononukleärer neutrophiler Granulozyten

Betrachtet man die Gesamtzellzahl der BAL, so zeigten sich in allen traumatisierten Tieren zum untersuchten Zeitpunkt erhöhte Zellzahlen gegenüber den jeweiligen untraumatisierten Kontrolltieren (ausgenommen DH + 1×10^7 nekrotische Zellen) (Abb. 21 A). Die Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen bei Trauma führte zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl in der BAL im Vergleich zur Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS).

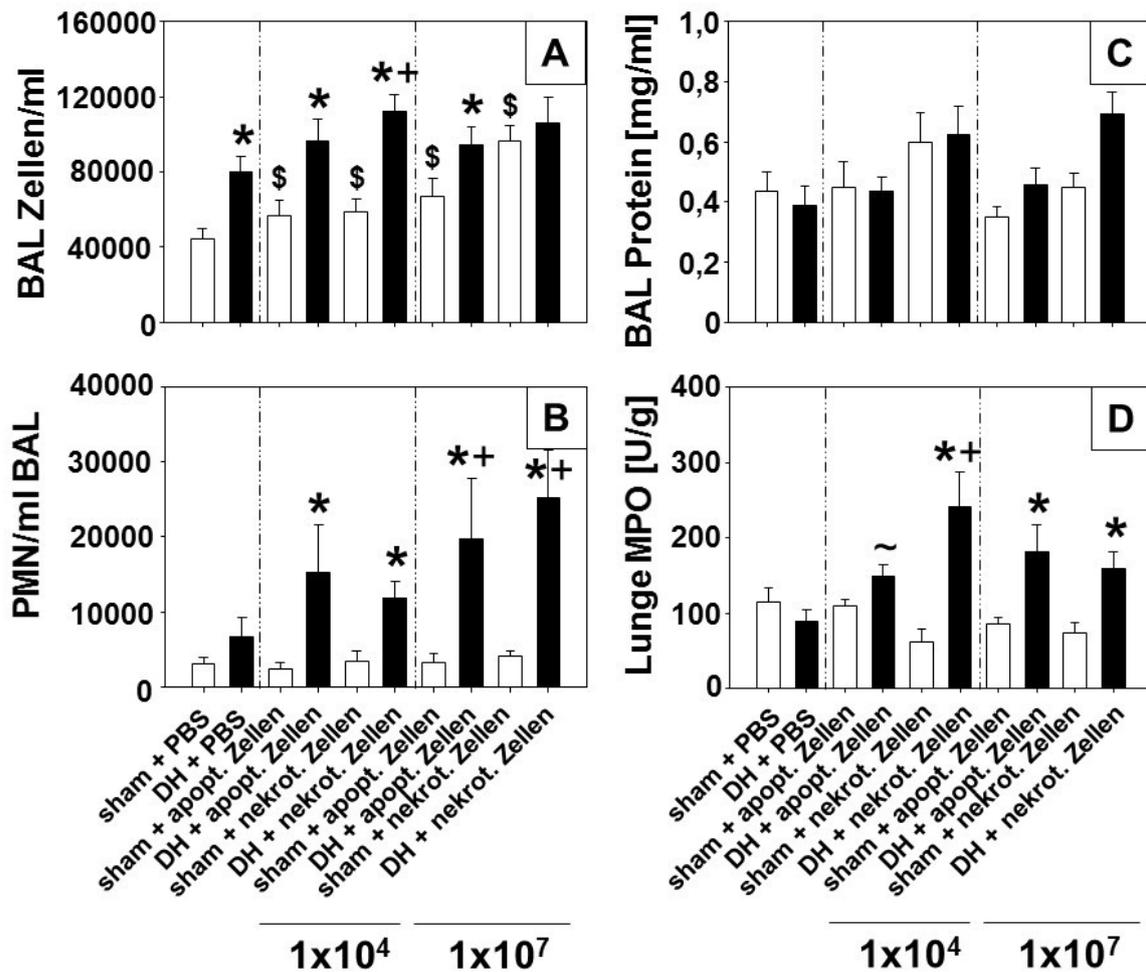


Abb. 21: Zellzahl/ml (A), die Zahl polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten je ml (PMN Anzahl/ml) (B) und der Proteingehalt (C) in der bronchoalveolären Lavage (BAL) sowie die Myeloperoxidase-Aktivität (MPO) (D) 32 Stunden nach Instillation von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), apoptotischen (apopt.) oder nekrotischen (nekrot.) Maus-Lungen-Epithelzellen (je 1×10^4 oder 1×10^7) in Kontrolltieren sowie C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma (TxT) und zökaler Ligation und Punktion (Zeitpunkt der Instillation 4 h nach TxT). Die Proteinbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption bei 562 nm. Für die Bestimmung der MPO wurde die Extinktion bei 450 nm bestimmt. Die Berechnung der Konzentration wurde mit einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden ermittelt. (n=4-8/Gruppe). * $p < 0,05$ vs. korrespondierender Kontrollgruppe, + $p < 0,05$ vs. DH + PBS, ~ $p < 0,05$ vs. DH + 1×10^4 nekrotische Zellen, \$ $p < 0,05$ vs. DH + Lungenhomogenat, \$ $p < 0,05$ vs. PBS Kontrollgruppe, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

Die untraumatisierten Kontrollen zeigten nach Instillation von apoptotischen und nekrotischen Zellen, unabhängig von der applizierten Zellzahl, eine signifikante Erhöhung der Gesamtzellzahl in der BAL im Vergleich zur Negativkontrolle (PBS). Alle traumatisierten Tiere wiesen eine signifikant erhöhte PMN-Infiltrationsrate gegenüber den nicht traumatisierten Tieren auf (ausgenommen DH + PBS) (Abb. 21 B). Darüber hinaus war die PMN-Anzahl in der BAL der traumatisierten Tiere nach Instillation von 1×10^7 apoptotischen und nekrotischen Zellen signifikant gegenüber der Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) erhöht. Die untraumatisierten Tiere zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer PMN-Anzahl in der BAL. Für den BAL-Proteingehalt war zum untersuchten Zeitpunkt eine (nicht signifikante) Erhöhung in den traumatisierten Tieren nach Instillation hoher Zellzahlen (1×10^7) für nekrotische und apoptotische MLE12-Zellen festzustellen (Abb. 21 C). Im Vergleich hierzu zeigten sich die anderen Interventionsgruppen gegenüber ihren jeweiligen Kontrollgruppen bezüglich des Proteingehalts der BAL unverändert.

3.6.2. Myeloperoxidase-Aktivität in der Lunge

Die Myeloperoxidase-Aktivität zeigte in den traumatisierten Tieren jeweils nach Instillation von PBS und 1×10^4 apoptotischen Zellen gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe keine Veränderung (Abb. 21 D). In den anderen untersuchten Gruppen war die MPO-Aktivität jeweils in den Lungen der traumatisierten Tiere gegenüber den untraumatisierten Kontrollen signifikant erhöht. Die Instillation von 1×10^7 apoptotischen Zellen nach Trauma führte zu einer signifikanten Erhöhung der MPO-Aktivität im Vergleich zu traumatisierten Tieren nach Applikation von einer geringeren Zahl apoptotischer Zellen (1×10^4).

Die Instillation von 1×10^4 nekrotischen MLE12-Zellen führte in den Lungen der traumatisierten Tiere zu einer signifikant erhöhten MPO-Aktivität im Vergleich zur Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS). Die Kontrollgruppen nach Instillation von 1×10^4 und 1×10^7 nekrotischen, sowie 1×10^7 apoptotischen MLE12-Zellen zeigten tendenziell erniedrigte MPO-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle (PBS).

3.6.3. Untersuchung der Zytokin-/Chemokinkonzentration in der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die Spiegel von KC in der BAL zeigten sich zum untersuchten 12 h-Zeitpunkt nach Trauma in allen traumatisierten Tieren gegenüber den Kontrollgruppen signifikant erhöht (Abb. 22 A). Die Instillation von 1×10^7 nekrotischen und apoptotischen sowie von 1×10^4

nekrotischen MLE12-Zellen führte zu einer signifikanten Erhöhung der KC-Konzentrationen in der BAL gegenüber der Trauma-Kontrollgruppe (PBS) und den Tieren, welchen 1×10^4 apoptotische Zellen appliziert worden waren. Schließlich war zu beobachten, dass die Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen nach Trauma auch gegenüber den traumatisierten Tieren, denen 1×10^7 apoptotische Zellen instilliert worden waren, zu einer signifikanten Erhöhung der KC-Konzentration in der BAL führte. Die G-CSF-Spiegel in der BAL waren in allen untersuchten traumatisierten Tieren gegenüber den nicht traumatisierten Tieren signifikant erhöht (Abb. 22 B). Die Instillation von 1×10^4 nekrotischen MLE12-Zellen führte in den traumatisierten Tieren im Vergleich zu den anderen Interventionsgruppen zum größten, jedoch von den anderen Gruppen nicht signifikant verschiedenen, Anstieg der G-CSF-Konzentrationen. MCP-1 zeigte sich lediglich in der Trauma-Kontrollgruppe sowie nach Instillation von nekrotischen Zellen (1×10^4 und 1×10^7) in der BAL traumatisierter Tiere gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen ohne Trauma signifikant erhöht (Abb. 22 C). Für IL-6, IL-10, IL-1 β und TNF α konnten in der BAL keine signifikanten Konzentrations-unterschiede zwischen traumatisierten Tieren und nicht traumatisierten Tieren festgestellt werden (ohne Abb.).

3.6.4. Untersuchung der lokalen Entzündungsantwort in der Lunge

Für KC war in der Lunge 12 Stunden nach Trauma in allen Tieren ein signifikant erhöhter Spiegel im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu beobachten (Abb. 22 D). Außerdem war die KC-Konzentration nach Instillation von 1×10^7 apoptotischen, nekrotischen und 1×10^4 nekrotischen Zellen signifikant gegenüber den Tieren der Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) und den traumatisierten Tieren, denen 1×10^4 apoptotische MLE12-Zellen instilliert worden waren, erhöht. Die Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen führte zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentrationen von KC in der posttraumatischen Lunge im Vergleich zu Tieren, denen 1×10^7 apoptotische Zellen instilliert worden waren. Die Kontrollgruppen zeigten zueinander keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die vorhandenen KC-Spiegel. Die G-CSF-Konzentration war in allen traumatisierten Tieren gegenüber den Kontrollgruppen erhöht, zeigte jedoch nur nach Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen Signifikanz (Abb. 22 E). Die MCP-1-Konzentrationen waren in der Lunge 12 Stunden nach Trauma in allen Tieren signifikant gegenüber den Kontrollgruppen erhöht (Abb. 22 D). Der MCP-Spiegel nach Instillation von 1×10^7 apoptotischen, nekrotischen und 1×10^4 nekrotischen Zellen wies außerdem eine signifikante Erhöhung in den Tieren der Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) und den traumatisierten Tieren, denen

1x10⁴ apoptotische MLE12-Zellen instilliert worden waren, auf.

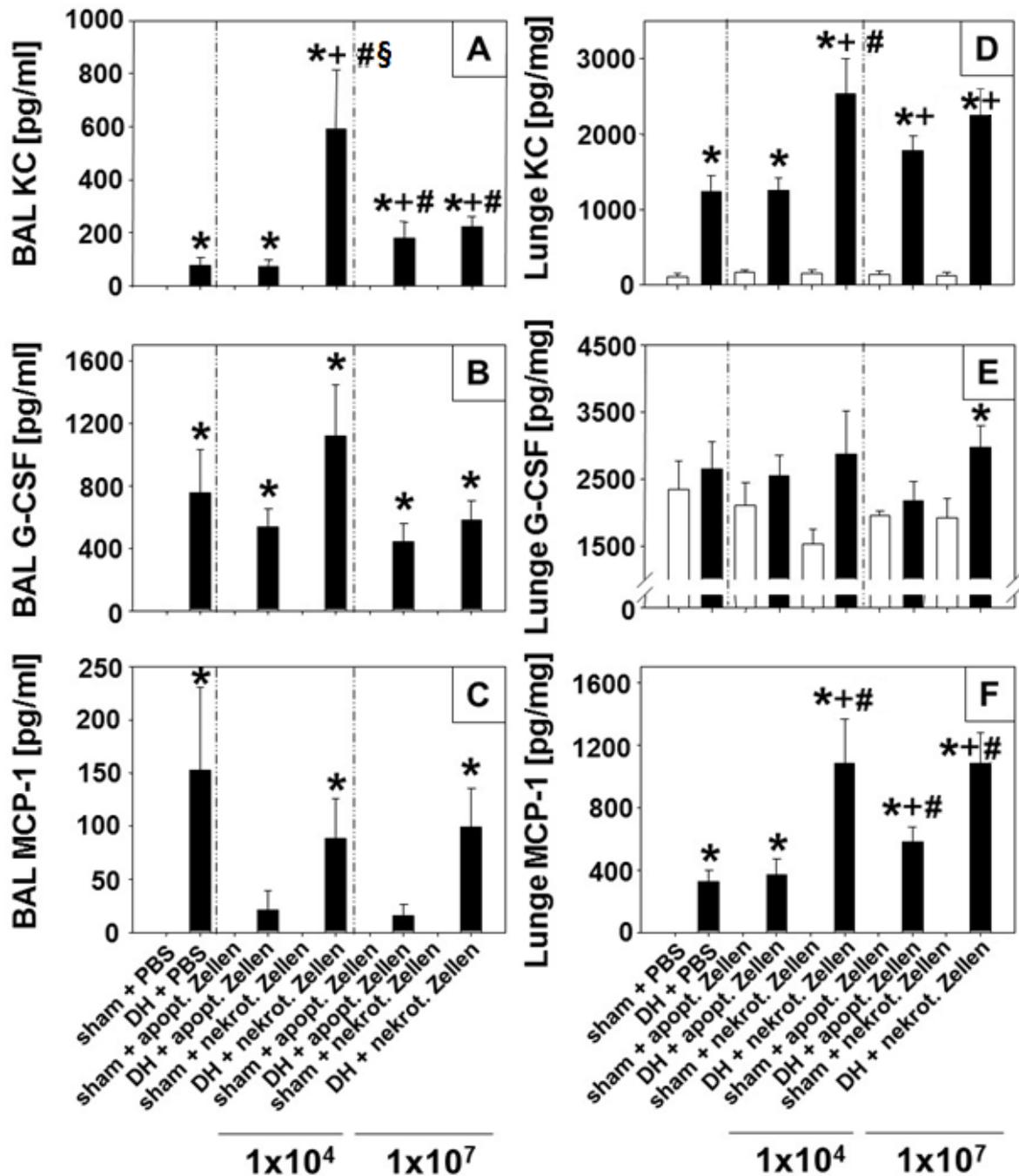


Abb. 22: Enzyme-linked immunosorbent assay zur Bestimmung der Konzentrationen von keratinocyte-derived chemokine (KC), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) und monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BAL) (A-C) und der Lunge (D-F) 32 Stunden nach Instillation von Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), apoptotischen (apopt.) oder nekrotischen (nekrot.) Maus-Lungen-Epithelzellen (je 1x10⁴ oder 1x10⁷) in Kontrolltieren sowie C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma (TxT) und zökaler Ligation und Punktion (Zeitpunkt der Instillation 4 h nach TxT). Messung der Extinktion bei 450 nm. (n=6-8/Gruppe). Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. *p<0,05 vs. korrespondierender Kontrollgruppe, +p<0,05 vs. DH + PBS, #p<0,05 vs. DH + 1x10⁴ apopt. Zellen, §p<0,05 vs. DH + 1x10⁷ nekrot. Zellen, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert ± Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

Die Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen führte zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentrationen von MCP-1 in der posttraumatischen Lunge im Vergleich zu Tieren, denen 1×10^7 apoptotische Zellen instilliert worden waren. Die analysierten Werte für MIP-2 in der Lunge wiesen nach Instillation apoptotischer Zellen in traumatisierten Tieren gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen eine signifikante Reduktion auf. Dagegen blieben die Werte aller anderen Gruppen ohne Unterschiede zueinander (ohne Abb.).

Für die Spiegel von IL-1 β , TNF α , IL-10 und IL-6 in der Lunge war in keiner der untersuchten Gruppen ein signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollen zu verzeichnen (ohne Abb.).

3.6.5. Untersuchungen der systemischen Entzündungsantwort

Die beobachteten Konzentrationen von IL-6, IL-10, KC, TNF α , G-CSF und MCP-1 im Plasma zeigten sich in allen traumatisierten Tieren zum evaluierten 12 h-Zeitpunkt nach Trauma, unabhängig von der jeweiligen Intervention gegenüber den Tieren der Trauma-Kontrollgruppe signifikant erhöht (DH + PBS) (Abb. 23 A-F). Die Instillation von 1×10^4 apoptotischen Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion des IL-6-Spiegels im Plasma der traumatisierten Tiere gegenüber der Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) (Abb. 23 A). Im Gegensatz hierzu zeigte sich nach Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen eine signifikante Erhöhung der IL-6-, IL-10- und KC-Konzentration im Vergleich zu allen anderen traumatisierten Tiergruppen (ausgenommen DH + 1×10^7 nekrotische Zellen) (Abb. 23 A-C). Die Gruppen-Profile von KC und MCP-1 zeigten eine hohe Ähnlichkeit. So waren die Verhältnisse der Chemokin-Konzentrationen hier nahezu identisch (Abb. 23 C und F). In den untraumatisierten Tieren zeigte sich für keine der untersuchten Interventionen eine Erhöhung bezüglich der hier gemessenen Zytokin-/Chemokinkonzentrationen.

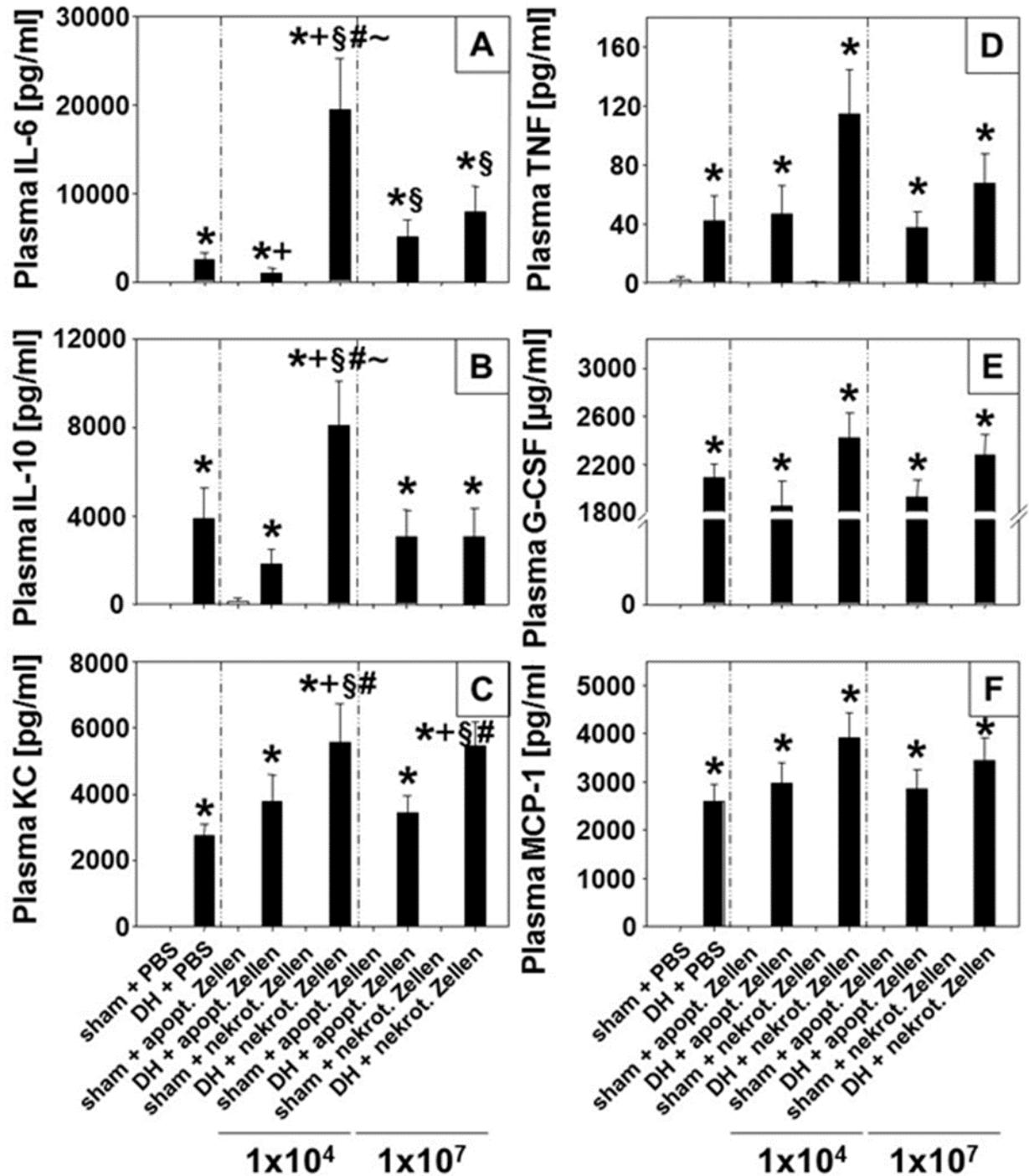


Abb. 23: Enzyme-linked immunosorbent assay zur Bestimmung der Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6) (A), Interleukin-10 (IL-10) (B), keratinocyte-derived chemokine (KC) (C), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) (D), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (E) und monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (F) im Plasma 32 Stunden nach Instillation von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), apoptotischen oder nekrotischen Maus-Lungen-Epithelzellen (je 1×10^4 oder 1×10^7) in Kontrolltieren sowie C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma (TxT) und zökaler Ligation und Punktion (Zeitpunkt der Instillation 4 h nach TxT). Messung der Extinktion bei 450 nm. ($n=9-12$ /Gruppe). Berechnung der Konzentration mittels einer aus Standardkonzentrationen erstellten Eichgeraden. * $p < 0,05$ vs. korrespondierender Kontrollgruppe, + $p < 0,05$ vs. DH + PBS, § $p < 0,05$ vs. DH + 1×10^4 apopt. Zellen, # $p < 0,05$ vs. DH + 1×10^7 apopt. Zellen, ~ $p < 0,05$ vs. DH + 1×10^7 nekrot. Zellen, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler. Das Experiment wurde 1x (unabhängig) durchgeführt.

3.6.6. Caspase-3 Westernblot an Lungenhomogenat

Um die Aktivität der Caspase-3 in der Lunge der Versuchstiere untersuchen zu können, wurden Westernblot Analysen durchgeführt. Dabei war zu beobachten, dass die Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen zu einer leichten Erhöhung der Menge an aktiver Caspase-3 in posttraumatischen Lungen im Vergleich zu den Kontrolltieren (PBS) oder den traumatisierten Tieren, welchen 1×10^4 apoptotische Zellen appliziert worden waren (Abb. 24), führte.

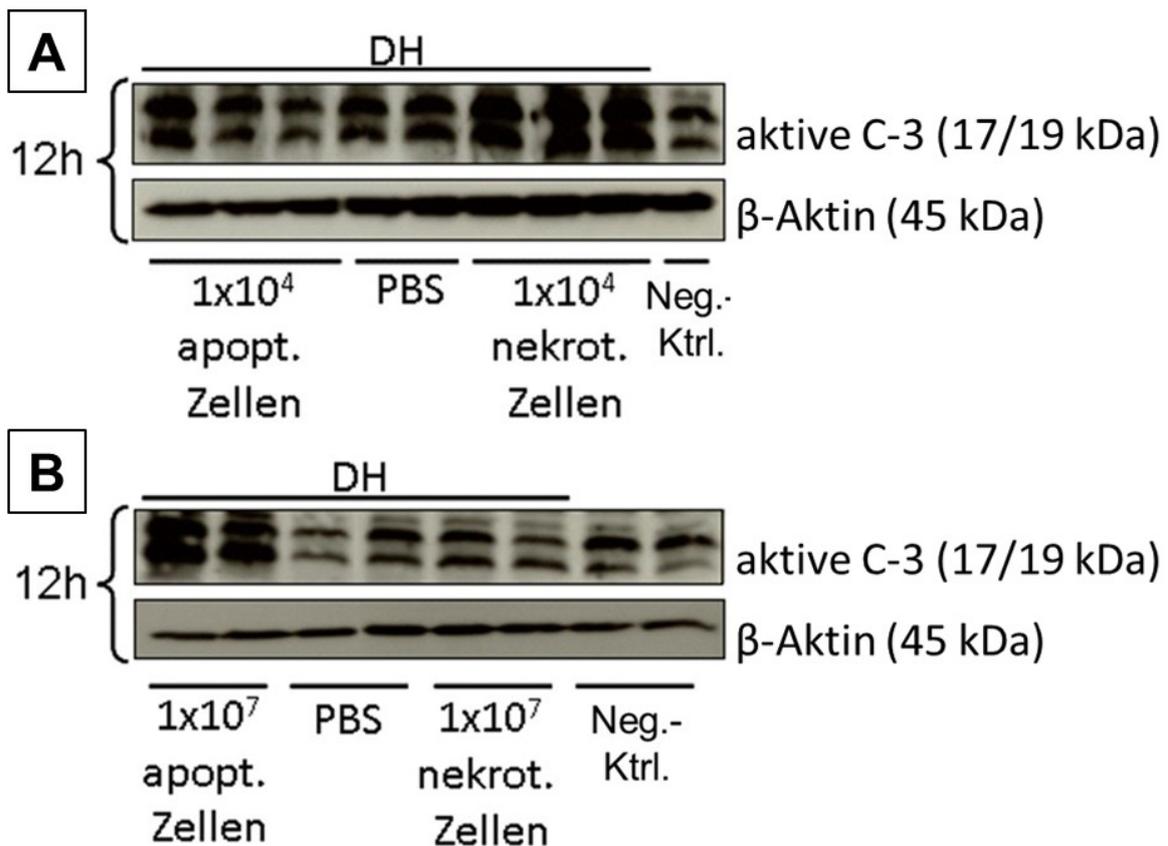


Abb. 24: Repräsentative Westernblot Analyse zur Quantifikation der aktiven Caspase-3 (Cleaved Caspase-3 (Asp175); aktive C-3 (17/19 kDa)) im Lungenhomogenat, 12 Stunden (h) nach CLP und 32 h nach Instillation von 1×10^4 (A) oder 1×10^7 (B) apoptotischen oder nekrotischen Maus-Lungen-Epithelzellen sowie Phosphat-gepuffertes Salzlösung (PBS) in Kontrolltieren sowie C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma und zökaler Ligation und Punktion. Als Negativkontrolle wurde nicht traumatisierten Kontrolltieren PBS instilliert (Neg.-Ktrl.). Zur Normalisierung diente der korrespondierende β -Aktin Re-Blot (β -Aktin (45 kDa)) ($n=2-3$ /Gruppe), Gezeigt ist jeweils einer von zwei unabhängigen Blots.

Bei Tieren, denen eine hohe Anzahl an MLE12-Zellen instilliert worden war, zeigte sich eine leichte Erhöhung der Caspase-Aktivität nach Instillation von 1×10^7 apoptotischen MLE12-Zellen, gegenüber den Kontrolltieren (PBS). Dagegen war in traumatisierten Tieren nach Instillation von 1×10^7 nekrotischen Zellen keine Erhöhung gegenüber den traumatisierten Kontrolltieren feststellbar.

3.6.7. Nachweis des akuten septischen Lungenschadens durch immunhistologische Verfahren

Die TUNEL-Färbung zur spezifischen Detektion von apoptotischen/nekrotischen Zellen in der Lunge zeigte in den traumatisierten Tieren eine gegenüber den Kontrollgruppen tendenziell erhöhte Anzahl an TUNEL-positiv gefärbten Zellen in der Lunge.

Eine signifikant erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellen, nach Instillation einer hohen Anzahl apoptotischer Zellen, war im Vergleich zur korrespondierenden untraumatisierten Kontrollgruppe (PBS) sowie zur Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS) zu beobachten. Des Weiteren zeigte sich ein signifikant verringertes TUNEL-Signal bei Tieren nach Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen, verglichen mit traumatisierten Tieren nach Instillation von 1×10^7 apoptotischen MLE12-Zellen.

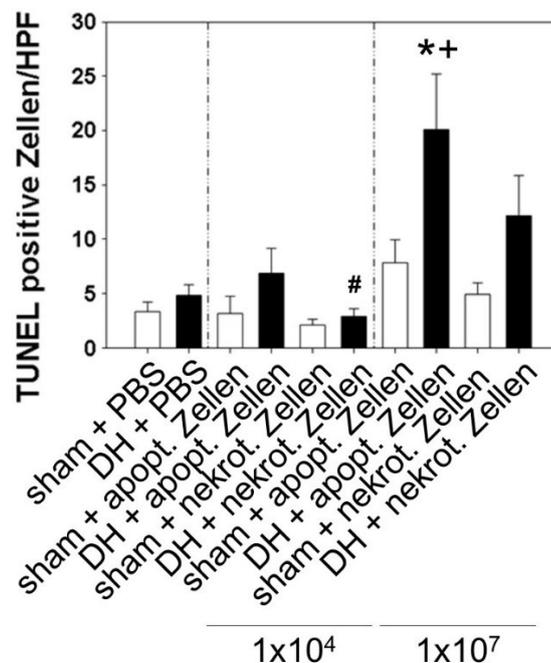
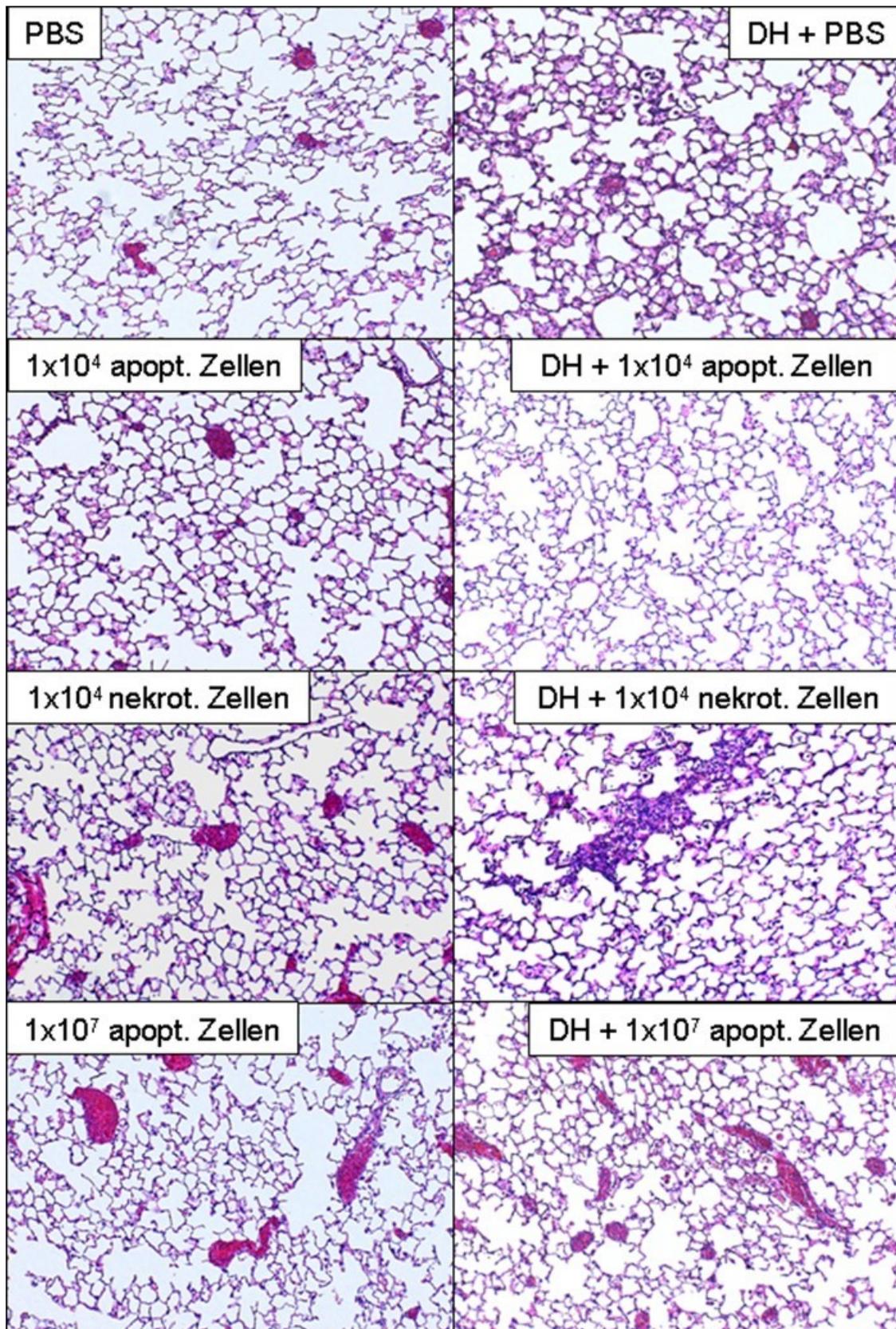


Abb. 25: Auswertung der TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) gefärbten, paraffinfixierten Lungengewebschnitte 32 Stunden nach Instillation von Phosphat-gepufferter Salzkösung (PBS), apoptotischen (apopt.) oder nekrotischen (nekrot.) Maus-Lungen-Epithelzellen (je 1×10^4 oder 1×10^7) in Kontrolltieren sowie C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma (TxT) und zökaler Ligation und Punktion (Zeitpunkt der Instillation 4 h nach TxT). TUNEL-positive Zellen wurden in jeweils 10 Gesichtsfeldern (high-power-fields, HPF) pro Präparat bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt ($n=4$ /Gruppe). * $p < 0,05$ vs. korrespondierende Kontrollgruppe, + $p < 0,05$ vs. DH + PBS, # $p < 0,05$ vs. DH + 1×10^7 apopt. Zellen, one-way ANOVA, SNK, Mittelwert \pm Standardfehler.

In Hämatoxylin/Eosin gefärbten histologischen Schnitten (Abb. 26) waren in den Traumagruppen 12 h nach Trauma deutliche Zeichen eines Lungenschadens zu erkennen. Insbesondere Charakteristika der Akuten Lungen Entzündung wie alveoläre Einblutungen,



Fortsetzung von Abb. 26 auf Seite 71

Fortsetzung von Abb. 26

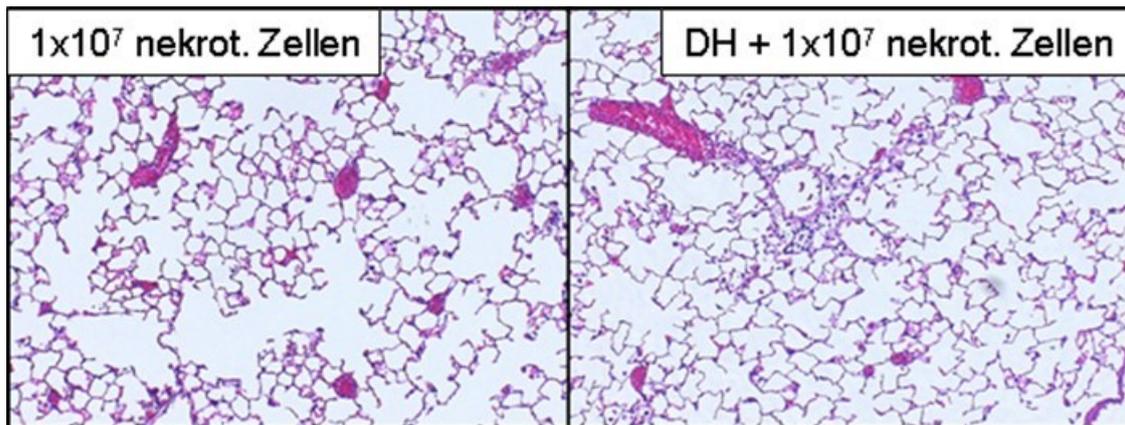
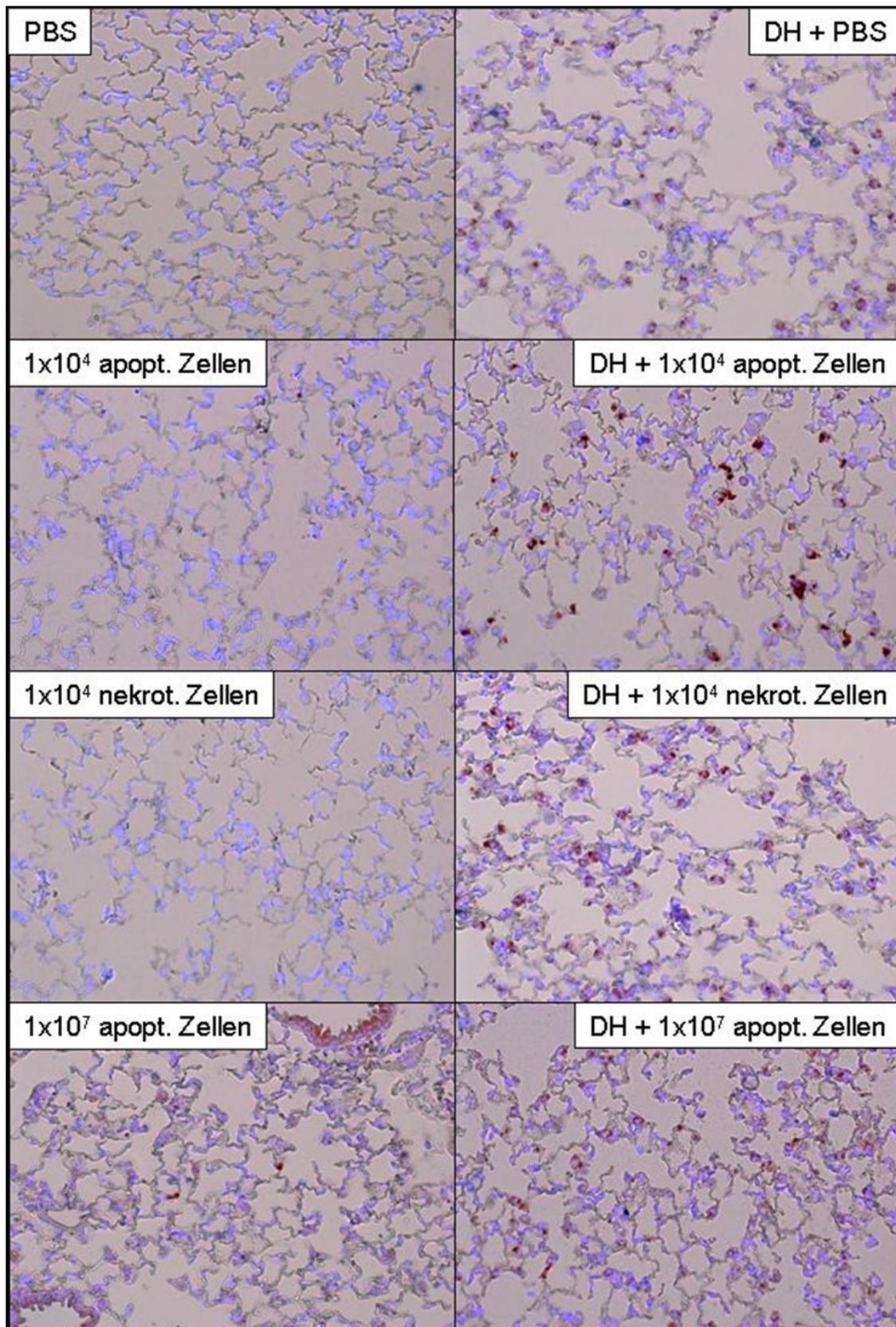


Abb. 26: Hämatoxylin/Eosin-gefärbte Lungengewebschnitte von untraumatisierten Kontrolltieren (linke Spalte) und traumatisierten C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma und zökaler Ligation und Punktion, sowie der Instillation von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (DH+PBS), oder von 1×10^4 bzw. 1×10^7 apoptotischen (apoptot.) oder nekrotischen (nekrot.) Maus-Lungen-Epithelzellen (rechte Spalte). 100-fache Vergrößerung.

Verdickung der alveolären Wände sowie die Ausbildung hyaliner Membranen, als Kennzeichen für die (Zer-)Störung der alveolokapillären Barriere, wurden in den Lungen aller Traumagruppen und demgegenüber in keiner der untraumatisierten Kontrollgruppen beobachtet. Beim Vergleich der Traumagruppen untereinander zeigten sich insbesondere in den Lungen der Tiere nach Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen sichtbar schwerere Lungenschäden. Vor allem die Anzahl der alveolären Einblutungen war hier deutlich erhöht.

Zur Validierung der Befunde zur Apoptose-Aktivität im Lungengewebe der untersuchten Versuchstiere, wurde neben der Analyse durch das TUNEL-Verfahren (Abb. 25) die Caspase-3-Aktivität immunhistochemisch untersucht (Abb. 27) (siehe 3.3.3.). Es zeigte sich, dass in den untraumatisierten Tieren, unabhängig von der jeweiligen Intervention, keine, nach Instillation von 1×10^7 apoptotischen Zellen, allenfalls eine sehr geringe Caspase-Aktivität beobachtbar war. Demgegenüber zeigten die traumatisierten Tiere, abhängig von der Intervention, Unterschiede in der Anzahl Caspase-3 gefärbter Zellen. Die größte Anzahl wurde in den traumatisierten Tieren nach Instillation einer hohen Anzahl apoptotischer Zellen beobachtet. Die Menge Caspase-3-gefärbter Zellen in traumatisierten Tieren nach Instillation einer niedrigen Anzahl apoptotischer Zellen zeigte sich gegenüber der Traumakontrolle (DH + PBS) leicht erhöht, während die Anzahl nach Instillation einer niedrigen Anzahl nekrotischer Zellen im Vergleich zu beiden vorgenannten Gruppen verringert war. Zusammenfassend war es durch die Caspase-3-Färbung möglich, die Beobachtungen der TUNEL-Färbungen (Abb. 25) weitgehend zu bestätigen.



Fortsetzung von Abb. 27 auf Seite 73

Fortsetzung von Abb. 27

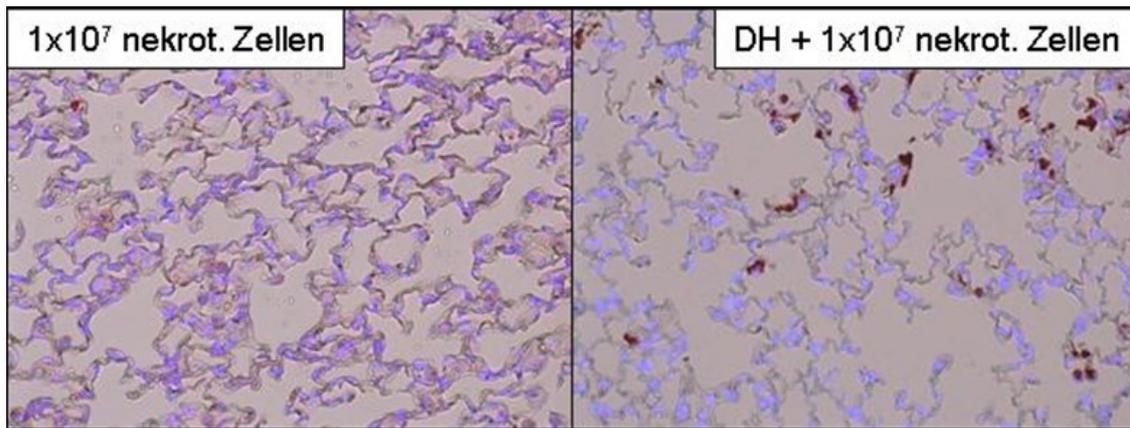


Abb. 27: Immunhistochemischer Befund zur Caspase-3-Aktivität (rotbraun) an Lungengewebsschnitten von untraumatisierten Kontrolltieren (linke Spalte) und traumatisierten C57BL/6-Mäusen nach double hit (DH), bestehend aus stumpfem Thoraxtrauma und zökaler Ligation und Punktion, sowie der Instillation von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (DH+PBS), sowie von 1×10^4 bzw. 1×10^7 apoptotischen (apopt.) oder nekrotischen (nekrot.) Maus-Lungen-Epithelzellen (rechte Spalte). Zur Kernfärbung (blau) wurde Bisbenzimidlösung (blau-violett) verwendet. 200-fache Vergrößerung.

4. Diskussion

4.1. UV-C induziert eine hohe Apoptose-Rate an Maus-Lungen-Epithelzellen

Ziel dieser Studie war es zunächst, ein standardisiertes Protokoll für die zuverlässige Induktion einer hohen Apoptose-Rate in einer Sekundärzelllinie zu erreichen. Dazu wurden MLE12-Zellen [183] verwendet. Im Zuge zahlreicher Versuchsreihen wurde ein Verfahren durch UV-C Bestrahlung optimiert, mit Hilfe dessen eine sehr gut reproduzierbare Apoptose-Rate induziert werden konnte. Als grundlegend sind hierzu die Arbeiten von Fadok und Mitarbeitern anzusehen, in denen die Apoptose-Induktion an Jurkat-T-Zellen durch zehn Minuten UV-Exposition bei 245 nm (= UV-C) durchgeführt wurde und nach zwei bis vier Stunden eine Apoptose-Rate von 60-80% beobachtet wurde [45],[81]. In der vorliegenden Arbeit wurden MLE12-Zellen für 60 sec mit UV-C ($0,148 \text{ Jls/cm}^2$) bestrahlt und 6 h nach Bestrahlung zu >70% als apoptotisch identifiziert. Mikroskopisch zeigte sich das Stadium der frühen Apoptose durch den Verlust der Adhärenz der MLE12-Zellen wenige Stunden nach Bestrahlung. Die Zellen rundeten sich ab und gingen in die Suspension über. Das Medium wurde schließlich abgenommen und enthielt den oben beschriebenen hohen Anteil an apoptotischen Zellen.

Die Apoptose wurde durch verschiedene Untersuchungen zur Charakterisierung des Vitalitätsstatus der Zellen nachgewiesen. Die Hauptuntersuchungsmethode stellte dabei die durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach Färbung mit dem Vitalfarbstoff AnnexinV (FITC-Kanal) und dem Avitalfarbstoff 7 Aminoactinomycin D (7-AAD; PE-Kanal) dar. Wie vorbeschrieben, exponieren früh apoptotische Zellen Phosphatidylserin (ein Phospholipid in der Membran tierischer und pflanzlicher Zellen) auf ihrer Oberfläche [73],[150]. Dieses wird damit für den nicht membrangängigen Liganden AnnexinV zugänglich, welcher spezifisch an den Phosphatidylserin-Rezeptor bindet [150]. Im Gegensatz dazu ist 7-AAD eine nicht membrangängige Substanz, die bei Vorhandensein größerer Poren in der zellulären Membran (typischerweise bei später Apoptose und Nekrose) in die Zellen eindringen kann [134]. Dort gelangt sie über den Zellkern, sofern dieser noch nicht vollständig desintegriert ist, zur DNA-Doppelhelix. Hier interkaliert der Farbstoff, begleitet von einer Veränderung des Fluoreszenzspektrums, spezifisch zwischen Cytosin und Guanin [178]. Durch positive Färbung mit AnnexinV bei gleichzeitig negativem Signal für 7-AAD werden Zellen als früh apoptotisch identifiziert (d.h. die Zellmembran ist noch intakt, aber die Zellen exponieren Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche). Färben die Zellen sich für AnnexinV und 7-AAD positiv, hat die Zelle ihre Integrität verloren. In diesem Fall ist sowohl Phosphatidylserin, an

der inneren oder äußeren Seite der Zellmembran, als auch die DNA-Doppelhelix der Zelle zugänglich. Der Verlust der zellulären Integrität ist ein markantes Merkmal sterbender Zellen. Spät apoptotische und sekundär nekrotische Zellen sind AnnexinV und 7-AAD positiv. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden physiologischen Zuständen der Zelle ist folglich durch die hier geschilderte Methode nicht zweifelsfrei möglich. Es wurde daher zusätzlich eine zytomorphologische Untersuchung der MLE12-Zellen nach UV-C-Exposition am Mikroskop (nach Hemacolor®-Färbung) durchgeführt und die Zellen als apoptotisch identifiziert (siehe 3.1.). So wiesen die Zellen eine zunehmend eosinophile Färbung auf, zeigten sich im Vergleich zu vitalen Zellen deutlich geschrumpft und an ihrer Oberfläche war eine deutliche Bläschenbildung zu erkennen. Der Zellkern wurde in den untersuchten Zellen sichtbar und das Chromatin verdichtete sich. Ein weiterer Nachweis des apoptotischen Charakters der Zellen wurde durch die deutliche Erhöhung der Caspase 3/7-Aktivität erbracht. Hier zeigte sich die Aktivität in den untersuchten Zellen gegenüber den Kontrollzellen etwa dreifach erhöht (siehe 3.1.). In Zusammenschau mit dem Ergebnis des darüber hinaus durchgeführten TUNEL-Assays, bei dem sich die UV-C-exponierten Zellen zu über 80% TUNEL-positiv gefärbt zeigten (siehe 3.1.), konnte angenommen werden, dass es sich, bei den so vorbereiteten Zellen, um apoptotische Zellen handelte.

Die Induktion von Nekrose wurde durch die dreimal aufeinanderfolgende Exposition der Zellen in flüssigem Stickstoff und langsames Auftauen bei Raumtemperatur erreicht [74]. Der Erfolg dieser Methode wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse nach AnnexinV/7-AAD Färbung bestimmt (siehe 3.1.). Im Anschluss an die vorgenannte Prozedur war über 90% nekrotisches (7-AAD positives/AnnexinV negatives) Zellmaterial zu beobachten. In einem ähnlichen Ansatz erreichten Yoon et al. eine Apoptoserate von ca. 70%. Dabei wurde ebenfalls UV-C-Strahlung, jedoch zur Apoptose-Induktion an humanen Jurkat- und HeLa-Epithelzellen sowie an primären Maus-Thymozyten verwendet [186].

4.2. Die Instillation apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen in die gesunde Mauslunge induziert eine selektive (lokale) transiente inflammatorische Reaktion

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Hypothese:

- 1. Die Präsenz einer großen Menge von apoptotischen Epithelzellen in der gesunden Lunge induziert eine pulmonale Entzündungsreaktion mit sekundärer Lungenschädigung.*

Dabei sollten die Effekte der Instillation einer die Phagozytosekapazität der

Alveolarmakrophagen übersteigende Zellzahl in einer intakten Lunge untersucht und mögliche Unterschiede in der Verwendung von apoptotischen sowie nekrotischen MLE12-Zellen herausgearbeitet werden. Die Erwartung zielte vor allem in die Richtung, dass das Überschreiten der Phagozytosekapazität im zeitlichen Verlauf zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion mit pulmonaler Schädigung führt.

Um den Einfluss der apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen auf die gesunde Lunge bestimmen zu können, wurde C57BL/6-Mäusen mit 1×10^4 eine geringe und 1×10^7 demgegenüber eine hohe Zellzahl instilliert. Die Analyse der Proben erfolgte 5 min, 6 h und 24 h nach Instillation des jeweiligen Materials.

In einer vergleichbaren Studie untersuchten Wang et al. die Wirkung apoptotischer Zellen nach Instillation in die Rattenlunge [179]. Dabei konnten sie insbesondere 28 Tage nach Instillation histologische Veränderungen im Vergleich zu Tieren, denen die gleiche Menge an vitalen Zellen instilliert wurde, beobachten [179]. In dieser Studie wurden jedoch Primärzellen aus der BAL gesunder Donortiere verwendet [179]. Sie beobachteten darüber hinaus in der BAL der untersuchten Tiere nach Instillation von apoptotischen Zellen erhöhte Konzentrationen an $\text{TNF}\alpha$ nach 1 Tag und $\text{TGF}\beta$ nach 7 Tagen [179]. Durch Markierung der apoptotischen Zellen wurde die Phagozytose durch Makrophagen quantifiziert. Nach 4 h wurden etwa 50% und nach 24 h $> 85\%$ der instillierten Zellen phagozytiert [179].

In einer weiteren Studie, an gesunden Mäusen, zeigten sich 24 h nach intravenöser Injektion (retroorbital) von 5×10^7 apoptotischen oder nekrotischen Splenozyten (Primärzellen) keine Effekte in Bezug auf die Zytokinkonzentration von $\text{IFN-}\gamma$ oder IL-4 im Überstand von 24 h bzw. 48 h *ex vivo* kultivierten und stimulierten (anti-CD3 und anti-CD28) Splenozyten [74]. Damit führte die Zellinstillation nicht zu einer Veränderung der T-Helferzellen Typ 1- (TH1) oder 2 (TH2)-Antwort [74].

Aufgrund des methodischen Aufwands der in dieser Arbeit durchgeführten Apoptose-Induktion an den MLE12-Zellen, verbunden mit einer Induktionseffizienz von ca. 40%, wurde keine höhere Zellzahl als die verwendeten 1×10^7 Zellen zur Instillation verwendet. Um die Vergleichbarkeit der beobachteten Effekte zu gewährleisten, wurden die Zellzahlen für apoptotische und nekrotische MLE12-Zellen analog appliziert.

Wie unter 3.2 beschrieben, war es durch die hohe Effektivität der Nekrose-Induktion dagegen möglich, eine Zellzahl von 1×10^8 MLE12-Zellen im Instillationsvolumen von 100 μl PBS zu suspendieren. Höhere Zellzahlen sind jedoch in diesem Fall aufgrund der dann vorhandenen großen Viskosität der Suspension (100 μl), bei gleichbleibendem Instillationsvolumen nicht möglich.

In dieser Studie zeigten sich insbesondere in Folge der Instillation von nekrotischem Zellmaterial auf Zytokin-Ebene deutliche Effekte. So konnte nach Instillation einer hohen nekrotischen Zellzahl 5 min nach Instillation eine signifikante Erhöhung des IL-6-/IL-10-Spiegels in der BAL beobachtet werden (siehe 3.3.1.). Dieser Effekt schwächte sich 6 h und 24 h nach Instillation zunehmend ab. Interessanterweise führte die Instillation einer hohen nekrotischen Zellzahl in Bezug auf das Zytokin KC, ein funktionales Homolog zum humanen IL-8, zu einer signifikant erhöhten Konzentration direkt nach Instillation (0 h) und erreichte seine maximale Höhe zum 6 h-Zeitpunkt. Es ist bekannt, dass Nekrose die Reaktion des angeborenen Immunsystems induziert und so zur Ausbildung einer Entzündungsantwort beiträgt [94],[141]. Dabei besitzen die durch Nekrose frei werdenden Gefahrenmoleküle, die sog. *Danger Associated Molecular Patterns* (DAMPs) (wie Nukleinsäuren (RNA, DNA und ATP), Kernproteine (e.g. HMGB 1) und Proteasen) durch Bindung an *toll-like receptors* (TLRs), vermittelt über *Myeloid Differentiation Primary Response Factor* (MyD88) und den Transkriptionsfaktor NF- κ B, das Potential, die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen/Chemokinen zu aktivieren [172]. Darüber hinaus konnten Perl und Kollegen zeigen, dass IL-6 bereits präformiert in den Zellen des Lungengewebes vorliegt [126]. Es wäre demnach denkbar, dass in der Lunge auch unmittelbar nach Instillation durch eine Rezeptor-vermittelte Freisetzung von präformiertem IL-6 eine Erhöhung in der BAL zu beobachten ist. Insbesondere die maximale Erhöhung von KC 6 h nach Instillation spricht für eine *de novo* Synthese durch residente oder in die Lunge eingewanderte Zellen, wie Makrophagen oder PMN. Ein vergleichbares Expressionsprofil beobachteten Armstrong und Kollegen im Rahmen eines Modells der chirurgischen Wunde an weiblichen C57BL/6-Mäusen [6]. Dabei konnten sie zeigen, dass insbesondere Endothelzellen KC exprimierten [6]. Sechs Stunden nach Gewebsverletzung wurde im Gewebehomogenat eine deutliche Erhöhung des KC-Spiegels beobachtet [6].

Fadok et al. beobachteten sowohl für früh als auch für spät apoptotische Zellen vergleichbare Effekte [46],[139]. So führte die Instillation von apoptotischen Neutrophilen in die Mauslunge zur Sekretion von TGF β , das anti-inflammatorisch wirkt und an Zellproliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt ist [46],[139]. Dagegen wurde in diesem Zusammenhang keine Erhöhung pro-inflammatorischer Faktoren, wie TNF α oder MIP-2 beobachtet [46],[139]. Damit besteht zumindest für einige Stunden der situative Effekt, dass die apoptotischen Zellen von Phagozyten erkannt und, wie unter 1.7 beschrieben, aus dem Alveolarraum eliminiert werden [46],[139]. Dass der Prozess der Phagozytose apoptotischer Primärzellen (Thymozyten) nicht in jedem Fall ohne

immunologische Konsequenzen bleibt, wurde durch intravenöse Injektion apoptotischer Zellen in gesunde C3H-Mäuse gezeigt, bei der die Bildung von Autoantikörpern zu beobachten war [112]. Lysierte Zellen induzierten die Freisetzung von IL-10 durch Makrophagen [112]. Dieser Effekt war maßgeblich auf das Vorhandensein von Serin Proteasen, hier v.a. der neutrophilen Elastase, zurückzuführen [46]. Für die in dieser Studie verwendeten MLE12-Zellen ist jedoch kein erhöhtes Vorhandensein von Proteasen beschrieben (vgl. hierzu die Zellcharakterisierung im Anhang).

Der Rückgang der Zytokinspiegel ist durch die kontinuierliche Beseitigung der DAMPs durch Proteasen, DNasen und andere Faktoren zu erklären, die insbesondere von neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden [8],[64]. Andererseits kann die Erhöhung der Chemokine in der BAL auch darauf zurückzuführen sein, dass die untersuchten Faktoren bereits im instillierten nekrotischen Zellmaterial (PBS-Suspension) vorlagen. Ausgehend von der Annahme, dass MLE12-Zellen *in vitro*, bei Vorhandensein optimaler Wachstumsbedingungen, keine inflammatorischen Mediatoren in größerer Menge exprimieren, müssten diese durch die Behandlung der Zellen zur Induktion der Nekrose im Vorfeld der Instillation synthetisiert worden sein. Dies würde aufgrund des methodischen Vorgehens der drei aufeinanderfolgenden Gefrier-/Auftauzyklen innerhalb weniger Minuten jedoch ebenso bedeuten, dass die untersuchten Chemokine/Zytokine entweder im Zuge des physikalischen Stresses durch Kontakt mit dem flüssigen Stickstoff *de novo* gebildet wurden, oder aber bereits in aktiver Form intrazellulär kompartimentiert (eingeschlossen in Vesikel) vorhanden waren. MLE12-Zellen zeigten sich im Rahmen eines *in vitro* Modells der Hypoxie mit anschließender Reoxigenierung in der Lage eine Vielzahl von Zytokinen/Chemokinen, wie KC, MCP-1, MIP-2, RANTES und IL-6 zu exprimieren [159]. De Paepe et al. wiesen nach, dass Hypoxie die Expression und Sekretion von Fas/FasL durch MLE12-Zellen induziert [39],[40]. Die verwendete Methode der Nekrose-Induktion ist jedoch nicht mit einer mehrstündigen Hypoxie vergleichbar. Nach Stimulation mit IL-13 exprimieren MLE12-Zellen vermittelt über Intelectin MCP-1 [63]. Nach Stimulation mit LPS konnte im Kulturüberstand von MLE12-Zellen IL-6 nachgewiesen werden [187]. Das bedeutet, dass die Zellen bei Vorhandensein eines entsprechenden exogenen Reizes in der Lage sind IL-6 zu exprimieren und zu sekretieren. Eine andere Arbeitsgruppe konnte weiterführend zeigen, dass die Exposition von MLE12-Zellen mit CD95 zu einer MyD88-abhängigen gesteigerten Expression von KC führte [1],[16],[52]. Hieran wird erkennbar, dass MLE12-Zellen durchaus in der Lage sind, pro-inflammatorische Mediatoren zu exprimieren. Es zeigt sich jedoch auch, dass dazu ein zellulärer Stressreiz, wie Hypoxie oder

PAMPs (wie LPS) vorliegen müssen [39],[40]. Gerade der Anstieg der KC-Konzentration, sechs Stunden nach Instillation, ist demnach voraussichtlich auf eine Reaktion residenter und/oder eingewanderter Zellen der Lunge zurückzuführen.

Die Instillation einer niedrigen Zellzahl von 1×10^4 führte weder bei apoptotischem noch nekrotischem Instillat zur einer nennenswerten Veränderung der Konzentration der untersuchten Zytokine/Chemokine (IL-6, IL-10 und KC) in der BAL. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Phagozytosekapazität/*Clearance* ausreichend war, um die instillierten apoptotischen Zellen und auch das nekrotische Zellmaterial aus dem intraalveolaren Raum zu entfernen und Entzündungsmediatoren (DAMPs) durch Aktivität von Proteasen zu inaktivieren. Wie bereits beschrieben, scheinen Proteasen sowohl an der Inaktivierung der DAMPs als auch über die Aktivierung der IL-10-Expression an der Induktion der Apoptose von Neutrophilen und der Verlängerung der Vitalitätsdauer von Makrophagen beteiligt zu sein [5],[36],[88]. Brouckaert et al. konnten zeigen, dass sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen durch Makrophagen erkannt und phagozytiert werden [24]. Dabei wurde in beiden Fällen die Beteiligung eines Phosphatidylserin abhängigen Mechanismus beobachtet [24]. Die hierzu durchgeführten *in vitro* Experimente mit speziellen L929sAhFas-Zellen (genetisch modifizierte Fibroblasten) zeigten in beiden Fällen der Phagozytose keine Expression pro-inflammatorischer Zytokine durch die Makrophagen [24].

Der Proteingehalt der BAL zeigte sich 5 min nach Instillation einer hohen Anzahl nekrotischer MLE12-Zellen (1×10^7) tendenziell gegenüber den anderen untersuchten Gruppen erhöht. Dies liegt insofern nah, dass die instillierten Zellen durch die Gefrier-/Auftauzyklen physikalisch aufgebrochen wurden und so die Freisetzung zuvor eingeschlossener zellulärer Bestandteile erfolgte, die zu einem großen Teil aus Proteinen zusammengesetzt sind. Insbesondere zytosolische Faktoren wurden so freigesetzt und zum frühen Zeitpunkt (fünf Minuten nach Instillation) in der BAL messbar. Es scheint eher unwahrscheinlich, dass die Instillation einer großen Menge nekrotischen Zellmaterials während der untersuchten Zeitpunkte eine Schrankenstörung ausgelöst hat, die ihrerseits zu einer Erhöhung des Proteingehalts geführt hätte. Diese Annahme wird durch Daten zur Zytokin-/Chemokinkonzentration im Plasma gestützt. Dort konnten sowohl nach Instillation einer hohen als auch einer niedrigen Anzahl an nekrotischen und apoptotischen Zellen in die gesunde Mauslunge für IL-6, IL-10, KC und MCP-1 keine nennenswerten Veränderungen im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren beobachtet werden. Demnach wurde durch die Instillationen, unabhängig vom Vitalitätsstatus der verwendeten MLE12-Zellen, keine

systemische Veränderung induziert. Diese Beobachtungen sprechen gegen das Vorliegen einer Störung der Blut-Luft-Schranke in den Lungen der untersuchten Tiere. Gegen eine Schrankenstörung spricht weiterhin der frühe Zeitpunkt der Probengewinnung. So kann davon ausgegangen werden, dass es innerhalb von wenigen Minuten nicht zu einer Schädigung der zellulären Integrität des Alveolarepithels durch Kontakt mit nekrotischem Zellmaterial kommt.

Fadok et al. haben in Experimenten mit lysierten Granulozyten gezeigt, dass eine Ko-Inkubation mit Makrophagen zur Bildung von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren, wie MIP-2, TNF α und IL-10 führt [46]. In diesen Experimenten wurde deutlich, dass die Inkubation mit Membranbestandteilen eher eine anti-inflammatorische und die Inkubation mit den löslichen Bestandteilen der lysierten Zellen eine pro-inflammatorische Reaktion induziert [46]. Die erhöhte Proteinkonzentration in der BAL nach Instillation von 1×10^7 nekrotischen MLE12-Zellen scheint zum ersten Untersuchungszeitpunkt mit den ermittelten Zytokin-/Chemokinkonzentrationen zu korrelieren. So zeigten sich analog dem Proteinlevel in der BAL auch IL-6, IL-10 und KC unmittelbar nach Instillation (5 min) signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Während nach 6 und 24 h dann abfallende Konzentrationen des Proteinlevels und für IL-6 und IL-10 beobachtet wurden, zeigte sich die Konzentration von KC nach 6 h maximal erhöht. Schließlich ist damit zumindest für KC von einer endogenen Erhöhung der Konzentration beispielsweise durch KC-Synthese von residenten Makrophagen auszugehen. Hier zeigt sich die besondere Bedeutung des zeitlichen Profils der vorgenommenen Messungen. Insbesondere die spezifische Kinetik der verschiedenen inflammatorischen Parameter kann gerade an Mäusen aufgrund des begrenzten Probenmaterials und dem Stresseffekt kontinuierlicher Messverfahren nicht vollständig untersucht werden.

Die Instillation vitaler, nekrotischer und apoptotischer Zellen in hoher Anzahl (1×10^7) führte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu signifikanten Veränderungen in der pulmonalen MPO-Aktivität. Es ist daher anzunehmen, dass die Instillationen, zumindest hinsichtlich der hier gewählten Messzeitpunkte, zu keiner gesteigerten Einwanderung oder Aktivierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut und angrenzendem Gewebe geführt haben. Dies erscheint insofern bemerkenswert, dass gerade bei Vorhandensein apoptotischer Zellen ein verstärktes Auftreten von Phagozyten zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise erfolgt die Beseitigung des apoptotischen Materials durch Phagozytose (auch Efferozytose) jedoch schrittweise, so dass mit der verwendeten Zellzahlermittlung zu definierten Zeitpunkten (0 h, 6 h und 24 h nach Instillation) keine messbaren Veränderungen beobachtet werden

konnten.

Hinsichtlich der ebenfalls bei der Ermittlung der Gesamtzellzahl zu berücksichtigenden Makrophagen-Zellen ist das Verhältnis von zu phagozytierender Zelle und Makrophage von Relevanz. So wurde darauf hingewiesen, dass die Instillation von 40 Millionen apoptotischen Zellen einem Verhältnis von Makrophagen/apoptotische Zellen von ca. 1/3 entspricht [81]. Überträgt man dieses Verhältnis auf die vorliegende Studie, ist hier von einem Verhältnis der Makrophagen zu den apoptotischen/nekrotischen/vitalen MLE12-Zellen von ca. 1:0,75 auszugehen. Demnach entfallen in der vorliegenden Studie auf eine instillierte Zelle, unabhängig von ihrem Vitalitätsstatus, mehr als eine Makrophagen Zelle in der murinen Lunge. Es muss angenommen werden, dass die Clearance-Kapazität damit nicht überschritten wird. Wie bereits beschrieben, konnten Wang und Kollegen zeigen, dass vier Stunden nach Instillation 50% und nach 24 h > 85% der 1×10^6 instillierten apoptotischen Zellen (Splenozyten) von Makrophagen aufgenommen wurden [179]. In dieser Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass die Instillation vitaler Zellen auch 28 Tage nach Instillation keine Effekte hinsichtlich der pulmonalen Apoptose-Rate (TUNEL- und Caspase-Aktivität) oder einer Zytokin-Induktion (TNF α und TGF β) hervorrief [179]. Im Gegensatz dazu zeigten sich 28 Tage nach Instillation apoptotischer Zellen deutliche morphologische Veränderungen in den Lungen der untersuchten Tiere, einschließlich deutlicher Hinweise auf eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen [179]. Da in der vorliegenden Studie diese späteren Zeitpunkte nicht untersucht wurden, ist nicht auszuschließen, dass insbesondere die apoptotische Zellinstillation Langzeiteffekte hervorruft.

4.3. Die Instillation von Lungenhomogenat und einer sehr hohen Anzahl nekrotischer Maus-Lungen-Epithelzellen (1×10^8) in die gesunde Mauslunge induziert einen kurzzeitigen Anstieg inflammatorischer Mediatoren

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Hypothese:

- 2. Syngenes Gewebe (Lungenhomogenat) und eine hohe Zahl nekrotischen Zellmaterials führt, intrapulmonal deponiert, in gesunden Tieren zur Induktion einer pulmonalen Entzündungsreaktion.*

Nachdem die Instillation von 1×10^7 vitalen, apoptotischen oder nekrotischen MLE12-Zellen in gesunden Tieren keine inflammatorische Reaktion induzierte, wurde in einer weiteren Studie der Einfluss einer höheren Anzahl nekrotischer MLE12-Zellen (1×10^8) und murinem

Lungenhomogenat *in vivo* untersucht. Dazu wurden die Effekte der nekrotischen Zellen 6 Stunden nach Instillation sowie des Lungenhomogenats 5 Minuten, 2 Stunden und 6 Stunden nach Instillation gewählt. Die Daten zur Bestimmung der Zytokinspiegel in der Lunge wurden jeweils auf die Proteinmenge des betreffenden Organs bezogen. So wurde es möglich absolute Aussagen zur Menge der untersuchten Faktoren zu treffen. Die Messung von IL-10 und IL-6 im Homogenat (vor Instillation) zeigte für IL-10 eine leicht erhöhte Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe (PBS 6 h), während IL-6 auf Kontrolllevel lag. Die Instillation des physikalisch aufgeschlossenen Lungenhomogenats führte zu einer bereits fünf Minuten (0 h) nach Instillation messbaren Erhöhung der Entzündungsmediatoren, hier vor allem des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 und des vorwiegend anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Crestani et al. zeigten im Rahmen von *in vitro*-Experimenten mit Ratten-ATII-Zellen, dass diese spontan IL-6 sekretieren [37]. Die gleiche Arbeit zeigte auch, dass die Expression durch IL-1 β und TNF α vor allem in humanen ATII-Sekundärzellen (A549) *in vitro* synergistisch induziert wurde [37]. *In vivo* konnte dagegen keine spontane IL-6-Expression nachgewiesen werden. Vielmehr wurde in der fibrotischen Lunge eine deutliche Erhöhung der IL-6-Expression in Alveolar Typ II (ATII)-Zellen beobachtet [37]. In der vorliegenden Arbeit wurde die ektomierte Lunge unmittelbar auf Eis gelagert und die Präparation des Lungenhomogenats vor der Instillation erfolgte ebenfalls bei 4°C. Es ist demnach davon auszugehen, dass gerade die Expression/Sekretion in Folge der verminderten biologischen Aktivität bei 4°C allenfalls eine marginale Rolle spielt. Fadok et al. weisen auf die Fähigkeit nekrotischer Zellen die Produktion von MIP2, TNF α und IL-10 zu induzieren hin, machen jedoch zugleich darauf aufmerksam, dass diese Effekte in Abhängigkeit von der untersuchten Zellart und dem jeweiligen Stimulationsgrad stehen [49]. Schließlich ist anzumerken, dass aufgrund der geringen Anzahl der hier verwendeten Versuchstiere (n=4), zwar eine Erhöhung der IL-6- und IL-10-Konzentration beobachtet, jedoch keine signifikanten Unterschiede nach Instillation festgestellt wurden. Die ausgesprochen deutliche Erhöhung des IL-10-Spiegels in der BAL fünf Minuten nach Instillation lässt demgegenüber eher auf pulmonale Effekte schließen. So kann die Erhöhung durch die unmittelbare Ausschüttung von IL-10 als Reaktion der Mauslunge auf die eingebrachten Faktoren des (nekrotischen) Lungenhomogenats induziert worden sein. *In vitro*-Studien mit nekrotischen (lysierten) Zellen legen dabei eine besondere Rolle der residenten Makrophagen nahe. So führte die Ko-Inkubation nekrotischer neutrophiler Granulozyten, im Gegensatz zu nekrotischen Jurkat-Zellen (Lymphozyten), zu einer Stimulation der IL-10-Sekretion bei murinen und humanen Makrophagen [46].

Interessanterweise zeigen Munoz et al., dass insbesondere primär nekrotische Zellen, deren Nekrose durch mechanischen Stress induziert wurde, die Sekretion von IL-10 durch Makrophagen vermindern [118]. Durch die frühe Erhöhung der IL-10-Konzentration nach Instillation von nekrotischem Zellmaterial (Lungenhomogenat) in der vorliegenden Studie, muss jedoch davon ausgegangen werden, dass lediglich residente, nicht aber eingewanderte Zellen am beobachteten IL-10-Spiegel in der BAL beteiligt sind. Die in der hier dargestellten Arbeit und auch in den Vorarbeiten vorgenommenen Messungen an unbehandelten Lungen zeigten regelmäßig kaum messbare Spiegel von IL-10. Dagegen konnten dort zumindest messbare Konzentrationen von IL-6 beobachtet werden. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass im reinen Lungenhomogenat (vor Instillation) vorhandenes IL-10, zumindest zum Teil, auch in der BAL (nach Instillation) messbar war.

Der Protein-Gesamtgehalt der BAL zeigte sich insbesondere nach Instillation des nekrotischen Zellmaterials deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht (3.3.). Dies steht in guter Korrelation mit den unter 4.2. diskutierten Ergebnissen, wo die Instillation von 1×10^7 nekrotischen Zellen bereits einen sichtbaren Effekt auf den Gesamtproteingehalt der BAL zur Folge hatte. Auch hier ist es zum Aufbrechen und dem damit verbundenen Freiwerden zuvor intrazellulärer Faktoren gekommen. Ähnliches lässt sich auch als Erklärung für relativ hohe Spiegel des ermittelten Proteingehalts im reinen Lungenhomogenat anführen. Durch die physikalische Aufschlussvariante der Homogenation wurden die Zellen aus ihrem Gewebeverband gelöst und zu großen Teilen mechanisch aufgebrochen. Durch diese Verfahren wurde die Integrität der Zellen bzw. des Gewebes zerstört und damit verschiedene Gefahrenmoleküle (DAMPs), wie HMGB1 [149], Harnsäure [160], ATP [67] und andere freigesetzt. Dass es infolge der Instillation dieses *DAMP-Cocktails* nicht zu einer Induktion der Entzündungsmediatoren, über den ersten Messzeitpunkt hinaus, gekommen ist, lag möglicherweise an der Wahl der Messzeitpunkte.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Instillation von Lungenhomogenat in die gesunde Mauslunge zu kurzfristigen inflammatorischen- und Protein-Effekten geführt hat, die sich aufgrund der lokalen *Clearance*-Kapazität in kurzer Zeit (hier 6 h) wieder normalisieren.

4.4. Die Instillation von Lungenhomogenat nach der Induktion einer thoraxtrauma-induzierten septischen Lungenschädigung führt zu einer Verstärkung der beobachteten Entzündungsantwort in Plasma und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Hypothese:

3. Durch die gezielte Applikation syngenen Gewebes (Lungenhomogenat) nach Trauma wird der Schweregrad des septischen ALI früh nach intrapulmonaler Applikation erhöht.

Um zu untersuchen, welche Effekte auf immunologischer Ebene die Instillation von Lungenhomogenat im Anschluss an die Induktion einer thoraxtraumainduzierten septischen Lungenschädigung in der Maus induziert (vgl. [127]), wurde entsprechend traumatisierten C57BL/6-Mäusen vier Stunden nach zökaler Ligation und Punktion murines Lungenhomogenat instilliert. Um initiale und konsekutive Effekte gut voneinander abzugrenzen, wurden die Proben unmittelbar (0 h) und sechs Stunden nach Instillation analysiert. Dazu wurden die Zytokin-/Chemokinkonzentrationen in der Lunge, der BAL und im Plasma sowie die Zellzahl und der Proteingehalt in der BAL bestimmt. Als Vergleichsgruppen wurden in dieser Studie zum einen Tiere verwendet, die nicht traumatisiert waren und denen PBS instilliert wurde. Zum anderen dienten Tiere als Kontrolle, die ebenfalls nicht traumatisiert waren, denen darüber hinaus jedoch intratracheal Lungenhomogenat verabreicht wurde.

Die Instillation von PBS und Lungenhomogenat führte bei nicht traumatisierten Kontrolltieren zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Erhöhung der ermittelten Zytokinspiegel im Plasma (KC, IL-10 und G-CSF) (3.4.1.). Demgegenüber wurden zum Zeitpunkt unmittelbar nach Instillation in traumatisierten Tieren signifikante Erhöhungen des Plasmaspiegels von KC in beiden Gruppen (DH + PBS und DH + Lungenhomogenat) beobachtet. 6 h nach Instillation in traumatisierten Tieren konnte im Plasma für KC und G-CSF eine gegenüber dem vorhergehenden Zeitpunkt (0 h) verstärkte Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollgruppen beobachtet werden. Die Instillation des Lungenhomogenats nach Trauma führte zu keiner signifikanten Veränderung der Zytokinspiegel im Vergleich zu den traumatisierten Kontrolltieren. Dies deutet auf eine bereits maximal ausgeprägte Antwort des Immunsystems bzw. eine maximale Entzündungsreaktion nach Trauma hin, welche durch das Vorhandensein von Gewebekomponenten (nach 0 und 6 h) nicht weiter verstärkt wurde. Die beobachteten

Konzentrationen von KC und G-CSF sind in Analogie zu den signifikanten Erhöhungen im gleichen Tiermodell zur akuten septischen ALI zum 12 h-Zeitpunkt zu sehen [111]. In dieser Studie wurden darüber hinaus auch signifikant erhöhte Werte für IL-6 und IL-10 im Plasma beobachtet [111]. Dass diese Erhöhungen in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet wurden, liegt vermutlich an dem um sechs Stunden vorverlagerten Messzeitpunkt nach Traumainduktion. Insgesamt kann hier festgehalten werden, dass die systemische Entzündungsreaktion nach *double-hit* durch die Instillation von Gewebehomogenat im untersuchten Zeitfenster nicht verstärkt wurde.

In der BAL zeigte sich 6 h nach Instillation des Lungenhomogenats in traumatisierten Tieren für KC eine signifikante Erhöhung gegenüber allen anderen untersuchten Gruppen (3.4.2.). Für die traumatisierten Tiere, denen kein Lungenhomogenat appliziert worden war, war keine signifikante Alteration der untersuchten Zytokine/Chemokine (KC, IL-6, IL-10 und TNF α) in der BAL zu beobachten. Die Instillation des Lungenhomogenats zeigte hingegen in nicht traumatisierten und in traumatisierten Tieren eine signifikante Erhöhung des Zytokinspiegels in der BAL für IL-10 und IL-6 (5 min nach Instillation) sowie TNF α 6 h nach Instillation. Zunächst ist anzumerken, dass sich die unter 5.3 diskutierten Ergebnisse mit signifikanter Erhöhung der IL-6- und IL-10-Konzentration in der BAL in nicht traumatisierten Tieren unmittelbar nach Instillation und fehlender Erhöhung nach 6 h bestätigt finden. Die Erhöhung von KC deutet auf die Aktivierung residenter Makrophagen und alveolarer Epithelzellen hin, welche durch die Sekretion von KC die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten forcieren [64]. Vergleichbare Studien zeigen ebenfalls eine Erhöhung von KC in der BAL nach Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter ALI, Trauma oder hämorrhagischem Schock [54],[78],[89]. Schließlich handelt es sich bei dem eingebrachten Homogenat um einen DAMP-Cocktail, welcher eine Vielzahl von Alarminen enthält. Dies sind Proteine wie HMGB-1 und IL-33, aber auch Proteasen, Membranbestandteile und RNAs, die sich extrazellulär als pro-inflammatorische Substrate auszeichnen [19],[28],[67],[81]. So werden immunologisch relevante Zellen alarmiert und rekrutiert. Die ohnehin vorhandene Gewebeschädigung in Folge des *double-hit* induzierten ALI wird damit als Signal für geweberegenerierende Zellen zusätzlich verstärkt. Zum untersuchten Zeitpunkt, 6 h nach Instillation, führte damit gerade die Instillation von Homogenat und Trauma zu einer verstärkten Rekrutierung von PMN, was sich auch in der PMN-Zahl der BAL (3.4.5.) widerspiegelt. Dabei ist jedoch einschränkend anzumerken, dass auch die Instillation von Lungenhomogenat ohne Trauma, 6 h nach Instillation, zu einem deutlichen Anstieg der Zellzahl in der BAL geführt hat. Hierbei könnte es sich um Zellen handeln, die

durch die chemotaktisch aktiven Faktoren (DAMPs) in die Lunge rekrutiert wurden, wie Makrophagen und weitere Leukozyten [76],[109],[184].

Die Erhöhung von TNF α weist auf eine Entzündungsreaktion in der Lunge hin. Lomas-Neira et al. zeigten in TNF α -defizienten Mäusen, dass die pathologischen Effekte der durch Sepsis (CLP) und Hämorrhagie induzierten ALI deutlich vermindert wurden [104]. Weckbach et al. haben im Modell der thoraxtraumainduzierten septischen ALI gezeigt, dass der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR1)-vermittelte Signalweg an der Pathophysiologie der ALI beteiligt ist [182]. So wurden an TNFR1-defizienten Tieren deutlich verminderte histologische Schäden beobachtet [182]. Insbesondere die beobachtete Erhöhung von TNF α in der BAL, 6 h nach Instillation, ist als Indiz dafür zu werten, dass die Instillation von Lungenhomogenat in die vorgeschädigte aber insbesondere auch in die gesunde Lunge zu einer, hier zunächst lokalen, inflammatorischen Antwort geführt hat. Diese Interpretation wird durch die veränderten Zytokinkonzentrationen in der Lunge (3.4.3.) untermauert. So konnten dort zahlreiche Veränderungen bezüglich der untersuchten Zytokine nach Instillation des Lungenhomogenats ermittelt werden. Ein hoher Spiegel von IL-6 unmittelbar nach Instillation von Homogenat, nach Trauma und auch ohne Trauma, kann hinsichtlich der Quelle nicht eindeutig beurteilt werden. Zum einen kann es sich dabei um unmittelbar in Folge der Instillation lokal freigesetztes, bereits zuvor vorhandenes IL-6 handeln, das unmittelbar sekretiert wurde. Dass IL-6 zellulär vorgeformt existiert, konnte für *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs; hierzu zählen u.a. Lymphozyten und Leukozyten) im Menschen nach Concanavalin A-Stimulation gezeigt werden [11]. Zum anderen kann hierbei jedoch auch eingebrachtes IL-6 gemessen worden sein.

Die Instillation von Lungenhomogenat in traumatisierten Tieren führte unmittelbar nach Instillation zu einer signifikanten Reduktion der MIP-2- und KC-Spiegel in der Lunge im Vergleich zur Trauma-Kontrollgruppe (3.4.3.). Dies könnte auf einen Verdünnungseffekt nach Instillation zurückzuführen sein. So zeigte sich auch in nicht traumatisierten Tieren nach Instillation von Lungenhomogenat eine leichte (nicht signifikante) Reduktion für MIP-2 und KC. Demgegenüber wurde 6 h nach Instillation von Lungenhomogenat eine deutliche Erhöhung von MIP-2 und G-CSF im Vergleich zur Trauma-Kontrollgruppe beobachtet. MIP-2 wirkt als Chemokin ähnlich wie MCP-1 und KC, auf die Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten [80],[181]. G-CSF spielt eine wesentliche Rolle in der Mobilisierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und anderen myeloiden Zellen des Knochenmarks [13],[157]. Damit führte die Instillation des Lungenhomogenats vor allem in traumatisierten Tieren zu einer Verstärkung der Rekrutierung von (vor allem)

neutrophilen Granulozyten in die Lunge, die sich auch in der BAL, wie nachfolgend gezeigt, widerspiegelt.

Die Menge an Protein in der BAL zeigte sich bereits in den nicht traumatisierten Kontrolltieren, denen Lungenhomogenat appliziert worden war, gegenüber den Kontrolltieren (PBS) signifikant erhöht. Dieser Effekt wurde auch durch das Trauma nicht zusätzlich verstärkt. 6 h nach der Instillation des Homogenats konnte in der BAL der traumatisierten und nicht-traumatisierten Tieren erheblich mehr Protein beobachtet werden, als in den traumatisierten Kontrolltieren (ohne Instillat). Dies ist zunächst einmal für den 5 min-Zeitpunkt nach Instillation damit zu erklären, dass durch die Instillation von Lungenhomogenat bestehend aus aufgebrochenen und morphologisch intakten Zellen und Gewebebestandteilen eine wesentliche Menge an Protein zusätzlich in die Lunge der Tiere eingebracht wurde (siehe hierzu auch 3.4.5.). Die Instillation des Lungenhomogenats am unbelasteten Kontrolltier scheint zu einer Belastung der gesunden Lunge zu führen, die auch die Blut-/Luft-Schranke nachhaltig schädigt. Dass die beobachtete Menge an Protein auch 6 h nach Instillation in den traumatisierten Tieren gleichbleibend erhöht erscheint, deutet hier ebenfalls auf eine Reaktion der Lunge auf das eingebrachte Instillat hin. Insbesondere der Vergleich zur traumatisierten Lunge ohne Homogenat, deren Proteinmenge von 5 min nach Instillation von PBS hin zum 6 h-Zeitpunkt abfällt, macht die Situation deutlich. Die induzierte ALI-Symptomatik wird durch die Instillation von Lungenhomogenat eventuell verstärkt, so dass die Lunge zum beobachteten Zeitpunkt (6 h) offenbar nicht im Stande zu sein scheint, die Menge an intraalveolär vorhandenem Material signifikant zu resorbieren, bzw. abzubauen.

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass sich die Inflammation durch die Instillation von murinem Lungengewebe gegenüber den traumatisierten Tieren, ohne Instillat, deutlich erhöht. Darüber hinaus zeigt sich, zumindest wenige Stunden nach Instillation, ein Überschreiten der *Clearance*-Kapazität der Lunge. Für eine gewisse Persistenz dieses Effekts sprechen die lokal erhöhten Mediatoren in der BAL bzw. dem Lungengewebe auch 6 h nach Instillation von Homogenat. Um den weiteren Verlauf dieser inflammatorischen Reaktion beurteilen zu können sind Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten erforderlich.

4.5. Die Instillation von apoptotischen Zellen in die traumatisierte Mauslunge führt 12 h nach Trauma zu einer verminderten systemischen Entzündungsreaktion

Im Rahmen dieser Studie wurde folgende Hypothese überprüft:

4. Durch die gezielte Applikation einer hohen Anzahl apoptotischer/nekrotischer Epithelzellen oder syngenen Gewebes (Lungenhomogenat) nach Trauma wird der Schweregrad des septischen ALI mittelbar nach intrapulmonaler Applikation erhöht.

Grundlage für die Untersuchungen war das *double-hit* Modell der thoraxtrauma-induzierten septischen Lungenschädigung [127]. Die Instillation des apoptotischen Zellmaterials (MLE12-Zellen) oder nekrotischen Zellmaterials (MLE12-Zellen oder Lungenhomogenat) erfolgte unmittelbar nach der zökalen Ligatur und Punktion, 24 h nach stumpfem Thoraxtrauma. Durch die Instillation der Zellen direkt im Anschluss an den *second-hit* sollte der Effekt einer Überlastung der phagozytären Kapazität in den traumatisierten Tieren untersucht werden. Dabei war die Prognose, dass sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen infolge der Überlastung zu einer Verstärkung des Lungenschadens und der systemischen Entzündungsreaktion führen.

In der Lunge war in traumatisierten Tieren 12 h nach Instillation von 1×10^7 apoptotischen MLE12-Zellen eine signifikante Reduktion der Chemokine KC und G-CSF gegenüber den traumatisierten Tieren nach Instillation von PBS (Kontrollgruppe) oder nekrotischen MLE12-Zellen zu beobachten. Diese Reduktion bestand tendenziell auch gegenüber traumatisierten Tieren nach Instillation von (nekrotischem) Lungenhomogenat, zeigte hier jedoch keine Signifikanz.

Die Deponierung apoptotischer MLE12-Zellen unmittelbar nach CLP führte damit zu einer anti-inflammatorischen Reaktion. Diese Beobachtung wird unterstützt durch verschiedene andere Studien, die anti-inflammatorische Effekte apoptotischer Zellen *in vitro* und *in vivo* nachweisen konnten [32],[47],[177]. Skoberne et al. wiesen jedoch darauf hin, dass auch pro-stimulatorische (pro-inflammatorische) Effekte durch apoptotische Zellen ausgelöst werden können [162]. Dies ist demnach maßgeblich von der Art der Apoptoseinduktion, dem Typ der phagozytotischen Zelle sowie den involvierten Rezeptoren, die an der Erkennung der apoptotischen Zelle beteiligt sind, abhängig [162]. Verschiedene Studien zeigten weiterhin, dass apoptotische Zellen in allen Stadien ihres programmierten Zelltodes anti-inflammatorische Effekte auslösen können [46],[122]. Durch Untersuchungen der chronischen Erkrankung des *Lupus Erythematoses*, bei welcher unter anderem die Beseitigung apoptotischer Zellen gestört ist, wurden durch spät apoptotische bzw. sekundär nekrotische Zellen pro-inflammatorische Effekte induziert [15],[55]. Diese Beobachtungen werden gestützt durch Studien an genetisch defizienten Mäusen für C1q [114], die Rezeptor Tyrosin Kinase MER [33] und MFG-E8 [66]. All diese Faktoren sind maßgeblich an der

Erkennung apoptotischer Zellen und deren Phagozytose beteiligt [152].

Im Modell des isolierten Thoraxtraumas in der Ratte konnten Seitz et al. zeigen, dass die Phagozytose von intratracheal instillierten Latex-Partikeln nach Trauma signifikant vermindert ist [155]. *Ex vivo* konnten anti-inflammatorische Effekte nach Phagozytose apoptotischer Zellen durch die Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden [155].

Auch auf systemischer Ebene wurde eine signifikante Reduktion von KC nach Instillation apoptotischer Zellen in traumatisierten Tieren gegenüber der Trauma-Kontrollgruppe und Tieren beobachtet, denen nach Trauma nekrotische MLE12-Zellen appliziert wurden. Darüber hinaus zeigte sich diese Reduktion auch für TNF α und IL-6 nicht aber für G-CSF. Dies deutet darauf hin, dass sich der anti-inflammatorische Effekt der Instillation von apoptotischen Zellen nach Trauma auch auf die systemische Reaktion übertragen und so zu einer Reduktion der ins Blut sezernierten Entzündungsmediatoren geführt hat.

Im Plasma zeigte sich eine signifikante Reduktion für IL-6 in allen traumatisierten Tieren nach Instillation im Vergleich Trauma-Kontrollgruppe (DH + PBS). Dies deutet zunächst darauf hin, dass auch die Instillation von nekrotischem Zellmaterial (MLE12-Zellen und Lungenhomogenat) zu einer anti-inflammatorischen Reaktion geführt haben könnte. Diese Beobachtung wird unterstützt durch Studien an lysierten Jurkat-Zellen die anti-inflammatorische Effekte in Bezug auf die Zytokinproduktion von Makrophagen zeigten, wogegen lysierte neutrophile Granulozyten pro-inflammatorisch wirkten [46]. In diesem Zusammenhang ist auch die Arbeit von Hotchkiss et al. zu sehen, bei der die intravenöse Applikation von nekrotischen Zellen (Splenozyten), hier jedoch fünf Tage vor Sepsisinduktion durch CLP, zu einem Überlebensvorteil dieser Tiere gegenüber Tieren, welchen apoptotische Zellen oder PBS appliziert wurden, geführt hat [74].

Da in der vorliegenden Arbeit jedoch nur ein Zeitpunkt untersucht wurde, ist hier keine Aussage über mögliche zeitabhängige Effekte in Bezug auf die Modulation der Entzündungsantwort durch apoptotische oder nekrotische Zellen nach akuter septischer Lungenschädigung zu treffen. Aus diesem Grund sollten Folgestudien durchgeführt werden, die die Entzündungsreaktion nach Instillation von apoptotischen/nekrotischen Zellen als therapeutische Intervention im Rahmen der akuten septischen Lungenschädigung im zeitlichen Verlauf untersuchen.

In der BAL war weder nach Instillation von apoptotischen MLE12-Zellen noch nekrotischem Zellmaterial (MLE12-Zellen oder Lungenhomogenat) eine signifikante Veränderung der Zytokinkonzentrationen von IL-6, IL-10, KC oder G-CSF in traumatisierten Tieren messbar. Alle Zellinstillationen führten zu einer leichten (nicht

signifikanten) Reduktion von IL-6, KC und G-CSF in den traumatisierten Tieren. Eine isolierte Betrachtung der beobachteten Effekte der Instillation apoptotischer MLE12-Zellen nach Trauma legt den Schluss nahe, dass auch in der BAL (analog zu den vorangehend diskutierten Effekten in Plasma und Lunge) eine anti-inflammatorische Charakteristik induziert wurde. Um diesen Zusammenhang jedoch zweifelsfrei herstellen zu können, ist ein Versuchsdesign mit einer höheren Untersuchungspopulation erforderlich. Verminderte Zytokinlevel nach Instillation von nekrotischem Zellmaterial in die traumatisierte Lunge könnten zum Beispiel aus einer bestehenden Wechselwirkung der durch die nekrotischen Zellen freigesetzten DAMPs wie HMGB1, Harnsäure oder ATP bestehen. Die Instillation von nekrotischem Zellmaterial und dem damit einhergehenden DAMP-Cocktail induziert nach Vorschädigung der Lunge durch Thoraxtrauma und die systemische Inflammation infolge der zökalen Ligation und Punktion eine Überlastung der phagozytären Kapazität in der Lunge, so dass auch 12 h nach Instillation noch eine große Menge an DAMPs in der Lunge verblieben ist. Darüber hinaus führt die polymikrobielle Sepsis dazu, dass der gesamte Organismus betroffen ist und große Mengen an neutrophilen Granulozyten über den Blutkreislauf an die Peripherie transportiert werden. Damit sind in der Lunge weniger neutrophile Granulozyten verfügbar, die aus dem Blut einwandern und sich an der Elimination der DAMPs beteiligen können. Diese Annahme wird durch die Beobachtung eines signifikant erhöhten Proteingehalts der BAL, 12 h nach Instillation von Lungenhomogenat, im Vergleich zu den traumatisierten Tieren nach Instillation von PBS (Kontrolle) und nekrotischen Zellen und einer demgegenüber nicht signifikant veränderten Gesamtzellzahl in der BAL unterstützt. Letztgültigen Aufschluss hierüber würde eine differenzierende Bestimmung der einzelnen Zellpopulationen in der BAL geben. In Bezug auf die Überschreitung der *Clearance*-Kapazität wurden etwas schwächere, wenngleich signifikante Effekte auch in Folge von Instillation apoptotischer Zellen nach thoraxtrauma-induzierter Schädigung der Lunge beobachtet. Hierfür könnten Effekte sekundärer Nekrose und die damit einhergehende Freisetzung proteolytischer, pro-inflammatorischer Substanzen ursächlich sein. Ren et al. machen in einer klinischen Studie darauf aufmerksam, dass Neutrophile auch in einem morphologisch gut charakterisierbaren Stadium später Apoptose sehr effektiv phagozytiert werden, was eher gegen Effekte durch sekundäre Nekrose sprechen würde [139].

Bemerkenswert ist, dass die untraumatisierten Kontrolltiere in der BAL erhöhte Konzentrationen von IL-6 und IL-10 zwölf Stunden nach Instillation von apoptotischem oder nekrotischem Zellmaterial im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) aufwiesen, während

diese Effekte in Lunge und Plasma nicht zu beobachten waren. Nekrotisches Zellmaterial induzierte darüber hinaus erhöhte Werte für KC in der BAL zum untersuchten Zeitpunkt. Diese Ergebnisse sind zunächst einmal im Vergleich zu den unter 4.2 diskutierten Beobachtungen zu sehen. Dort führte die Instillation von 1×10^7 apoptotischen Zellen in die Lunge unbehandelter Tiere zu keiner signifikanten Veränderung der Konzentration von IL-6, IL-10 oder KC nach 0 h, 6 h oder 24 h. Das wesentliche Unterscheidungsmerkmal der Studien 4.2 und 4.4 sind die untersuchten Zeitpunkte sowie die Kontrollbehandlung der Tiere mit sham Prozeduren zum Thoraxtrauma und der zökalen Ligation und Punktion. Wie in vorangehenden Studien gezeigt wurde, führen die genannten sham Prozeduren nicht zu einer signifikanten Veränderung der Zytokinspiegel in der BAL [111],[127]. Demnach sind die beobachteten Effekte mit großer Wahrscheinlichkeit auf das instillierte Zellmaterial zurückzuführen. In Zusammenschau mit den Ergebnissen in 4.2 folgt demnach, dass die Instillation von apoptotischen MLE12-Zellen nicht 0 h, 6 h und 24 h, wohl aber 12 h nach Instillation eine signifikante Erhöhung der Konzentrationen von IL-6 und IL-10 in der BAL untraumatisierter Tiere induziert. Da diese Resultate aus der Synthese zweier verschiedenen Studien gefolgert werden, müssen sie in einer Folgestudie verifiziert werden. Gleiches gilt für die Erhöhung der Zytokinspiegel nach Instillation von nekrotischem Zellmaterial (MLE12-Zellen) in gesunden Tieren. Hier wurde in 4.2 eine signifikante Erhöhung von IL-6 und IL-10 unmittelbar nach Instillation und für KC unmittelbar und 6 h nach Instillation in der BAL beobachtet.

Zusammen mit der hier diskutierten Studie zeigt sich eine erneute Erhöhung von IL-6 und IL-10 12 h nach Instillation. Interessanterweise stellt sich KC bei 3 der 4 Messzeitpunkte (0 h, 6 h und 12 h) signifikant erhöht dar. Die Instillation von Lungenhomogenat in die gesunde Mauslunge führte, wie unter 4.3 beschrieben, unmittelbar nach Instillation zur einer erhöhten IL-10-Konzentration in der BAL, wogegen sich diese 2 h und 6 h nach Instillation wieder auf Kontrolllevel zeigte. Auch hier muss der beobachtete Anstieg von IL-10 und KC (in 4.3 nach 0 h, 2 h und 6 h unverändert) in der BAL 12 h nach Instillation durch eine Folgestudie untersucht werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Deponierung einer hohen Zahl apoptotischer Zellen, entgegen der Hypothese, zu einer Reduktion der inflammatorischen Parameter zum untersuchten Zeitpunkt (12 h) geführt hat. Dies spricht dafür, dass trotz der hohen Zahl instillierter apoptotischer Zellen (1×10^7) auch nach Trauma eine hinreichende phagozytäre Kapazität erhalten geblieben ist und dass die positiven Effekte apoptotischer Zellen auf die Immunmodulation [32],[47],[177] potentiell destruktive Effekte (über)kompensiert

haben [46],[162].

4.6. Die Instillation von apoptotischen/nekrotischen Zellen im Rahmen des ALI-Modells in der Maus führt zu einer differenzierten Veränderung der Entzündung in Abhängigkeit von der verwendeten Zellzahl

Im Rahmen dieser Studie wurden folgende Hypothesen überprüft:

- 5. Durch die gezielte Applikation einer kleinen Menge apoptotischer/nekrotischer Epithelzellen kann der Schweregrad des septischen ALI vermindert, durch die gezielte Applikation einer hohen Menge apoptotischer Epithelzellen dagegen kann der Schweregrad des septischen ALI erhöht werden.*

Ausgangspunkt für die Untersuchungen stellte das *double-hit* Modell der thoraxtrauma-induzierten septischen Lungenschädigung dar [127]. Die Instillation der apoptotischen oder nekrotischen MLE12-Zellen erfolgte vier Stunden nach Applikation des Thoraxtraumas und damit 20 h vor der zökalen Ligatur und Punktion. Dabei sollte durch die Instillation apoptotischer MLE12-Zellen ein anti-inflammatorischer Phänotyp der Alveolarmakrophagen hervorgerufen werden [12],[47],[48],[148]. Dieser, so die Hypothese, führe dann dazu, dass die untersuchten Tiere für die nachfolgende septische Lungenschädigung weniger empfänglich sein würden und es damit insgesamt zu einem milderen Verlauf der beobachteten Lungenschädigung kommt.

Alternativ dazu konnten Hotchkiss und Mitarbeiter zeigen, dass im Rahmen der CLP-induzierten Sepsis in der Maus, die intravenöse Injektion apoptotischer Zellen das Überleben signifikant verschlechtert [74]. Demgegenüber führte die Injektion nekrotischer Zellen zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensrate [74]. Als Zellmaterial wurden 5×10^7 gamma-bestrahlte apoptotische bzw. Gefrier-/Auftauzyklen unterzogene nekrotische Splenozyten (Primärzellen) verwendet [74]. Die zeitgleiche Injektion der Zellen mit der CLP-Prozedur führte zu keinem Überlebensvorteil, unabhängig vom Vitalstatus der instillierten Zellen. Effekte waren erst nachweisbar, als die Injektion fünf Tage vor CLP Intervention durchgeführt wurde. Die inflammatorischen lokalen oder systemischen Konsequenzen wurden in dieser Studie jedoch nicht untersucht, so dass zur genaueren Analyse dieses Bereichs Folgeuntersuchungen durchgeführt werden sollten.

In unserer Studie wurde der 12 h-Zeitpunkt nach Sepsisinduktion durch CLP zur Untersuchung der Tiere verwendet. Die Wahl des Zeitpunkts richtete sich vor allem nach

dem in vorangegangenen Studien detailliert beschriebenen thoraxtraumainduzierten septischen Lungenschaden [111],[127],[182]. So war in den genannten Studien insbesondere 12 Stunden nach CLP eine Vielzahl der charakteristischen Merkmale der ALI zu beobachten (siehe 1.4; [127]). Dazu sind eine erhöhte Apoptoserate in der Lunge, eine Störung der alveolar-kapillaren Barriere und Veränderungen in der Histologie der Lunge zu zählen. Letztere zeichnet sich durch Infiltrate, vor allem Granulozyten im intraalveolären Raum, eine zerstörte alveoläre Architektur, verdickte Alveolarwände und Ödembildung aus.

Die Instillation von 1×10^4 apoptotischer Zellen nach Trauma zeigte systemisch im Plasma für IL-6 eine signifikante Reduktion der Konzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren. Eine analoge Tendenz war für IL-10 zu beobachten. Isoliert betrachtet spricht dies für einen anti-inflammatorischen Effekt einer geringen Anzahl apoptotischer Zellen, wie in der Ausgangshypothese angenommen. Gestützt wird diese Beobachtung durch Daten anderer Studien [12],[47],[48],[110],[148],[177]. Voll et al. konnten zeigen, dass die Gegenwart apoptotischer Zellen während der Aktivierung von Monozyten durch LPS dazu führt, dass letztere das anti-inflammatorische IL-10 sekretieren, sowie die Sekretion der pro-inflammatorischen Faktoren TNF α , IL-1 und IL-12 supprimieren [177]. Fadok et al. konnten zeigen, dass diese anti-inflammatorischen Effekte durch TGF β , Prostaglandin E2 und *Platelet-Activating-Factor* (PAF) vermittelt werden und der Phosphatidylserin-Rezeptor auf der Oberfläche von Phagozyten eine Schlüsselrolle beim Erkennen und Phagozytieren apoptotischer Zellen durch Makrophagen spielt [47],[48].

Ein anderes Bild zeigte sich bei der Untersuchung der BAL. Hier führte die Instillation apoptotischer MLE12-Zellen (1×10^4) zu einer signifikanten Reduktion der Konzentration von MCP-1, wohingegen die Konzentration von KC und G-CSF zum untersuchten Zeitpunkt gegenüber den PBS-Kontrolltieren unverändert blieb (Abb. 22, S. 65). MCP-1, ein Ligand des CCR2-Rezeptors, stimulierte die Reparatur in einem *in vitro*-Wundheilungsmodell mit murinen ATII-Zellen [31]. Darüber hinaus ist es ein maßgebliches Zytokin im Rahmen der Rekrutierung von Phagozyten in die Lunge [109]. Demnach würde ein reduzierter Spiegel an MCP-1 in der Lunge zu einer verminderten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus dem extraalveolären Raum in die Lunge führen. Dies wird jedoch durch eine unveränderte Anzahl an PMN in der BAL, im Vergleich zur Trauma-Kontrollgruppe, in der vorliegenden Studie nicht bestätigt (siehe 3.6.1.). Paradoxe Weise konnten McDonald et al. durch LPS-Aktivierung von Makrophagen und nachfolgender Phagozytose apoptotischer Jurkat-Zellen beobachten, dass die anti-inflammatorischen Effekte zwar zu einer Reduktion der Chemokine KC und MIP-2 führte, die MCP-1-Konzentration davon jedoch unbeeinflusst

blieb [110]. Die Autoren folgerten daraus, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen die Rekrutierung von weiteren Monozyten aufrechterhalten, die Rekrutierung der PMN jedoch verringern sollte [110]. Da es sich bei der vorbeschriebenen Studie jedoch um eine *in vitro* Situation handelt, ist diese nur bedingt als Vergleich zur *in vivo* Situation der akuten septischen Lungenschädigung der vorliegenden Arbeit geeignet. Vielmehr ist die Kinetik der Entzündungsmediatoren, wie sie durch den *double-hit* aus Thoraxtrauma und Sepsis induziert wird wesentlich komplexer und von unzähligen Einflussfaktoren und zellulären Interaktionsmustern moduliert.

Im Lungenhomogenat wurden durch keine der verwendeten Interventionen verminderte Zytokin/Chemokin-Konzentrationen im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren hervorgerufen (siehe 3.6.3.). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die apoptotischen Zellen zum Zeitpunkt der Untersuchung (12 h nach *double-hit*/22 h nach Instillation) phagozytiert waren und die Effekte in der Lunge nicht mehr messbar waren. Folgestudien, die eine Kinetik der Entzündungsreaktion erkennen lassen, sollten zur Beantwortung dieser Frage durchgeführt werden.

Ein besonderes Augenmerk ist auf die Effekte nach Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen zu richten. Erstaunlicherweise zeigten sich hier insbesondere bei der Analyse der inflammatorischen Parameter in BAL, Lunge und Plasma zum Teil signifikant erhöhte Konzentrationen im Vergleich zur Instillation einer hohen Anzahl nekrotischer Zellen oder der Trauma-Kontrollgruppe, vor allem aber im Vergleich zur Intervention mit apoptotischen Zellen. Ausgehend von der Rolle der PMN bei der Pathophysiologie der akuten Lungenschädigung ist in diesem Kontext die Betrachtung der Myeloperoxidase-Aktivität als Nachweis der PMN-Aktivität in der geschädigten Lunge von Interesse. So führte die Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der MPO-Aktivität gegenüber der untraumatisierten Kontrolle und der Trauma-Kontrollgruppe (siehe 3.6.1.). Ursächlich für diese Erhöhung kann zum einen eine erhöhte Anzahl an PMN in der Lunge sein. Dies war jedoch anhand der Zelldifferenzierung in der BAL nicht nachweisbar. Zum anderen kann eine erhöhte Aktivität der PMN bei unveränderter Anzahl vorliegen [64]. Eine leichte Erhöhung der Gesamtzellzahl in der BAL deutet bei unveränderter Anzahl der PMN in der BAL darauf hin, dass hier vor allem Lymphozyten und/oder Monozyten erhöht waren. Betrachtet man die Konzentration weiterer PMN-rekrutierender Faktoren, zeigt sich in der BAL und der Lunge KC besonders stark erhöht. Zusammen mit der ebenfalls beobachteten Erhöhung von G-CSF in der BAL ist davon auszugehen, dass die Instillation einer geringen Anzahl nekrotischer Zellen, zwölf Stunden nach CLP, zu einer verstärkten

Rekrutierung von PMN in die Lunge geführt hat. Es ist daher zu vermuten, dass die Erhöhung der PMN-rekrutierenden Faktoren (wie KC und MIP-2) zum 12 h-Zeitpunkt mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung zur erhöhten Migration der Monozyten und ihrer konsekutiven Differenzierung zu Makrophagen geführt hätte. Seitz et al. haben im Modell eines isolierten Thoraxtraumas an der Ratte gezeigt, dass Alveolarmakrophagen ebenso wie ATII-Zellen maßgeblich an der Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren und deren Sekretion nach Trauma beteiligt sind [154],[155]. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass Monozyten ihre Chemokin-Rezeptor-Expression verändern und in die Lungen rekrutiert werden [154],[155].

Im Rahmen der Westernblot Analyse war nach Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen gegenüber den PBS-Kontrolltieren und der Instillation von 1×10^4 apoptotischen Zellen eine größere Aktivität der Caspase-3 im Lungenhomogenat nachzuweisen (siehe 3.6.6.). Diese Erhöhung konnte jedoch im Rahmen der TUNEL-Analyse an Dünnschnittpräparaten nicht mit einer erhöhten Rate an apoptotischen Zellen untermauert werden (siehe 3.6.7.). Erklärend dafür kann eine gesteigerte Aktivität der Caspase-3 in einer definierten Anzahl an pulmonalen Zellen sein. Wie an anderer Stelle gezeigt wurde, ist die Effektorcaspase Caspase-3 nicht nur am programmierten Zelltod sondern auch im Rahmen von Gewebs-Differenzierung und -Regeneration beteiligt [158]. Bei den gefärbten Zellen handelt es sich um alveolare Epithelzellen, während keine intraalveolären apoptotischen Zellen vorhanden waren. Dies lässt darauf schließen, dass die instillierten apoptotischen Zellen zum Untersuchungszeitpunkt bereits aus der Lunge entfernt waren. Eine mögliche Erklärung für die Epithelzellapoptose könnte eine unvollständige oder verzögerte Efferozytose der instillierten apoptotischen MLE12-Zellen sein, die zu einer sekundären Nekrose dieser Zellen geführt hat. Sekundär nekrotische Zellen setzen dann DAMPs frei, die ihrerseits Apoptose in umliegenden Zellen induzieren können. Schwulst et al. wiesen sowohl für nekrotische als auch apoptotische Zellen „trans“-Effekte nach, die in umliegenden Zellen Apoptose auslösen [151]. In den traumatisierten Tieren waren in allen untersuchten Lungenpräparaten Caspase-3-positive Zellen vorhanden. Dies bestätigt zum einen die TUNEL-Untersuchungen und ist zum anderen ebenfalls ein Indiz für eine verminderte Phagozytose-Kapazität nach Thoraxtrauma und damit einhergehende sekundäre Nekrose der instillierten MLE12-Zellen. Gerade diese Nekrose stellt im vorliegenden Modell eine Zusatzbelastung der Lunge, durch vermehrtes Vorhandensein von DAMPs in der akuten septischen ALI, dar und induziert so eine erhöhte Apoptose-Rate in den Epithelzellen der geschädigten Lunge. Weiteren Aufschluss hierüber würde eine genauere Untersuchung der

chemischen Zusammensetzung der BAL liefern, die insbesondere auf das Vorhandensein der DAMPs abzielt.

4.7. Grenzen der vorliegenden Studien und Implikationen für nachfolgende Untersuchungen

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Maus-Tiermodell der akuten septischen ALI hat sich als ausgesprochen geeignet zur Reproduktion des humanen Krankheitsbildes des ALI/ARDS gezeigt [127]. Generell ist jedoch eine kritische Betrachtung der Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus dem Tiermodell auf die humane klinische Situation notwendig [106],[121],[140]. Wobei unter anderem Parameter wie Alter und Geschlecht eine maßgebliche Rolle spielen [101]. Die hier durchgeführten Studien haben gezeigt, dass die murine Lunge, insbesondere im gesunden Zustand, in der Lage ist, eine ausgesprochen hohe Anzahl an apoptotischem aber auch nekrotischem Zellmaterial ohne nachhaltige Schädigung, wie etwa Entzündungsreaktionen, zu beseitigen. Insgesamt wurde nach den verschiedenen Interventionen nicht immer das gleiche Spektrum an Untersuchungszeitpunkten gewählt. Die jeweils verwendeten Zeitpunkte richteten sich maßgeblich nach den vorliegenden Erfahrungen mit dem Tiermodell in Verbindung mit der jeweiligen Fragestellung. Durch die Verwendung der entsprechenden Kontrollen war es jedoch stets möglich die Beobachtungen einzuordnen. Schließlich wurde durch die zytologische Charakterisierung der MLE12-Zellen, auch im zeitlichen Verlauf, weitgehend ausgeschlossen, dass Sekundäreffekte die Instillationsprozeduren beeinflussen. Vergleichbares ist auch für die Verwendung des Lungenhomogenats zu konstatieren. So wurden auch hierfür versuchsrelevante Parameter, hier vor allem die Zytokin-/Chemokinkonzentrationen, versuchsbegleitend *ex vivo* bestimmt.

Die erzielten Erkenntnisse und aufgeworfenen Fragen eröffnen schließlich ein großes Spektrum an Anknüpfungspunkten für Folgeuntersuchungen. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Bearbeitung der Frage von Bedeutung, welche therapeutischen Effekte die Instillation apoptotischer/nekrotischer Zellen im zeitlichen Verlauf nach Trauma (*double-hit*) auslöst. Damit einhergehend sollten auch Überlebensstudien mit unterschiedlichen Trauma-Stärken durchgeführt werden, die protektive und schädigende Einflüsse der instillierten Zellen deutlicher sichtbar machen. Zur genaueren Untersuchung der Bedeutung von Alveolarmakrophagen im untersuchten ALI-Modell sollten z.B. Studien mit Mäusen durchgeführt werden, die eine signifikant reduzierte Anzahl an Makrophagen aufweisen, wie

z.B. *Csf1op* Mäuse. Eine vorangehende Depletion der Makrophagen in C57BL/6-Tieren, durch Instillation von Clodronate-Liposomen, ist eine denkbare Alternative. Allerdings sind hier pro-inflammatorische Effekte in Folge der Depletion per se als problematisch einzuschätzen.

Die vorliegenden Untersuchungen sind im Wesentlichen mit der Sekundären Epithelzelllinie MLE12 durchgeführt worden. In nachfolgenden Studien ist daher von besonderem Interesse, welche Effekte die Instillation apoptotischer Primärzellen, wie z.B. PMN oder Epithelzellen, auf die Pathophysiologie im murinen ALI-Modell zeigen. Auch *in vitro* Untersuchungen sind naheliegend, die in Ko-Inkubationsanalysen eine mechanistische Analyse der Prozesse im Rahmen der Effekte von apoptotischen/nekrotischen MLE12-Zellen auf die Lungenepithelzellen ermöglichen. Hier ist jedoch ebenfalls darauf zu achten, dass *in vitro* Effekte resultieren könnten, die im Gewebeverband und der dort vorherrschenden Zellumgebung nicht entstehen würden.

5. Zusammenfassung

Zunächst wurde eine effektive Methode zur Apoptose-Induktion in Maus-Lungen-Epithelzellen (MLE12-Zellen) etabliert, die im Anschluss daran für die Instillationsversuche verwendet werden konnte. Dabei wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, dass *ex vivo* eine klare Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen möglich war, was durch verschiedene immunhistochemische Verfahren (AnnexinV/7-Aminoactinomycin, Westernblot und *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL)) realisiert wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit zeigte sich, dass die Instillation von 1×10^4 oder 1×10^7 vitalen oder apoptotischen Zellen in die gesunde Lunge der Versuchstiere geringe immunologisch erfassbare Effekte induziert. Demgegenüber führte die Instillation von 1×10^7 nekrotischen Zellen zu deutlichen Veränderungen des Zytokinprofils in der bronchoalveolären Lavage (BAL). Während in Lungengewebe oder Plasma, unmittelbar und 6 Stunden (h) nach Instillation, nur geringe Veränderungen beobachtet werden konnten. 24 h nach Instillation zeigten sich die untersuchten Parameter in allen untersuchten Gruppen normalisiert. Somit ließen sich nach Gabe einer hohen Zahl nekrotischer Zellen in die gesunde Mauslunge, unmittelbare (vorwiegend) pro-inflammatorische Effekte nachweisen.

Um die maximale Auslastung bzw. *Clearance*-Kapazität der murinen Lunge zu untersuchen, wurden 1×10^8 nekrotische MLE12-Zellen und Lungenhomogenat in gesunde Tiere appliziert. Die Instillation von 10mg/100µl Lungenhomogenat führte unmittelbar nach Instillation zu einer signifikanten Erhöhung von Interleukin-10 (IL-10) in der BAL, die 2 h nach Instillation nicht mehr nachweisbar war. 6 h nach Instillation von 1×10^8 nekrotischen Zellen konnte, anders als nach Gabe von Lungenhomogenat, eine deutliche Erhöhung des Proteingehalts in der BAL beobachtet werden. Schließlich erwies sich die *Clearance*-Kapazität der Versuchstiere, zu den frühen Untersuchungszeitpunkten (0 h, 2 h und 6 h) damit für das Lungenhomogenat als ausgesprochen hoch. Dagegen führte die Instillation nekrotischer Zellen auch 6 h nach Instillation noch zu deutlichen Anzeichen einer Überschreitung der lokalen *Clearance*-Kapazität. Es bleibt damit vor allem im letztgenannten Fall zu untersuchen, welche Langzeiteffekte in Folge der Verabreichung eines hoch konzentrierten Instillats ($\geq 1 \times 10^8$ Zellen) zu beobachten sind.

Um mögliche additive Effekte in der vorgeschädigten Lunge zu untersuchen, wurde die Instillation des Lungengewebes in dieser Studie im Anschluss an einen thoraxtraumainduzierten septischen Lungenschaden durchgeführt. Dabei wurde insgesamt eine Verstärkung des Lungenschadens, zum hier gewählten 6 h-Zeitpunkt, vor allem

hinsichtlich der Inflammation, beobachtet. So zeigten sich insbesondere polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)-attraktive Chemokine, wie *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2) und *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) in der Lunge oder *keratinocyte-derived chemokine* (KC) in der BAL, erhöht.

Zur Untersuchung additiver Effekte durch apoptotische/nekrotische Zellen, wurden diese nach Trauma instilliert. Dabei zeigte sich 12 h nach Gabe apoptotischer Zellen insbesondere in der Lunge eine verminderte Konzentration der Chemokine, KC und G-CSF. Zusammen mit mildereren aber in der Tendenz vergleichbaren Effekten in BAL und Plasma führte die Gabe apoptotischer Zellen in hoher Zahl, 12 h nach Trauma, zu einer verminderten systemischen Entzündungsreaktion.

Abschließend wurde eine geringe (1×10^4) oder eine hohe (1×10^7) Zellzahl apoptotischer oder nekrotischer MLE12-Zellen, 4 Stunden nach Thoraxtrauma und somit 20 Stunden vor zökaler Ligation und Panktion (CLP) instilliert. Die Untersuchung der histologischen und immunologischen Effekte 12 Stunden nach CLP zeigte insbesondere nach Instillation von 1×10^4 nekrotischen Zellen eine Erhöhung der untersuchten Entzündungsparameter in BAL und Plasma. Dies spricht für eine modulatorische Wirkung einer geringen Konzentration an nekrotischem Zellmaterial. Ein protektiver Effekt in Bezug auf die Schwere des Lungenschadens konnte zum hier gewählten Zeitpunkt, weder durch die Instillation apoptotischer noch nekrotischer Zellen, beobachtet werden.

Insgesamt konnte die Arbeit zeigen, dass eine therapeutische Intervention durch Verabreichung apoptotischer oder nekrotischer Zellen im Rahmen des Maus-Modells des akuten septischen Lungenschadens möglich erscheint. Jedoch sind die dabei zu berücksichtigenden Parameter, wie der zeitliche Verlauf oder die Stärke des Traumas, sehr komplex und bedürfen daher weiterer Untersuchungen.

6. Literaturverzeichnis

1. Allan, G., Bhattacharjee, P., Brook, C.D., Read, N.G. & Parke, A.J. Myeloperoxidase activity as a quantitative marker of polymorphonuclear leukocyte accumulation into an experimental myocardial infarct--the effect of ibuprofen on infarct size and polymorphonuclear leukocyte accumulation. *Journal of cardiovascular pharmacology* **7**, 1154–1160 (1985).
2. Andreeva, A.V., Kutuzov, M.A. & Voyno-Yasenetskaya, T.A. Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **293**, L259-71 (2007).
3. Angus, D.C. The lingering consequences of sepsis: a hidden public health disaster? *JAMA* **304**, 1833–1834 (2010).
4. Angus, D.C. & Wax, R.S. Epidemiology of sepsis: an update. *Critical care medicine* **29**, S109-16 (2001).
5. Arai, T., Hiromatsu, K., Nishimura, H., Kimura, Y., Kobayashi, N., Ishida, H., Nimura, Y. & Yoshikai, Y. Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during Salmonella infection. *Biochemical and biophysical research communications* **213**, 600–607 (1995).
6. Armstrong, D.A., Major, J.A., Chudyk, A. & Hamilton, T.A. Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury. *Journal of leukocyte biology* **75**, 641–648 (2004).
7. Ashbaugh, D.G., Peters, G.N., Halgrimson, C.G., Owens, J.C. & Waddell, W.R. Chest trauma. Analysis of 685 patients. *Archives of surgery (Chicago, Ill.: 1960)* **95**, 546–555 (1967).
8. Ayala, A., Chung, C.-S., Lomas, J.L., Song, G.Y., Doughty, L.A., Gregory, S.H., Cioffi, W.G., LeBlanc, B.W., Reichner, J., Simms, H.H. & Grutkoski, P.S. Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice: divergent effects of TLR-4 and TLR-4/FasL deficiency. *The American journal of pathology* **161**, 2283–2294 (2002).
9. Bachofen, M. & Weibel, E.R. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clinics in chest medicine* **3**, 35–56 (1982).
10. Baker, C.C., Chaudry, I.H., Gaines, H.O. & Baue, A.E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* **94**, 331–335 (1983).
11. Balo-Banga, J.M., Schweitzer, K., Lakatos, S. & Sipka, S. A novel rapid (20-minute) IL-6 release assay using blood mononuclear cells of patients with various clinical forms of drug induced skin injuries. *The World Allergy Organization journal* **8**, 1 (2015).
12. Barker, R.N., Erwig, L., Pearce, W.P., Devine, A. & Rees, A.J. Differential effects of necrotic or apoptotic cell uptake on antigen presentation by macrophages. *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology* **67**, 302–305 (1999).
13. Basu, S., Hodgson, G., Katz, M. & Dunn, A.R. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* **100**, 854–861 (2002).
14. Bateman, B.T., Schmidt, U., Berman, M.F. & Bittner, E.A. Temporal trends in the epidemiology of severe postoperative sepsis after elective surgery: a large, nationwide sample. *Anesthesiology* **112**, 917–925 (2010).
15. Baumann, I., Kolowos, W., Voll, R.E., Manger, B., Gaipf, U., Neuhuber, W.L., Kirchner, T., Kalden, J.R. & Herrmann, M. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **46**, 191–201 (2002).

16. Bem, R.A., Farnand, A.W., Wong, V., Koski, A., Rosenfeld, M.E., van Rooijen, N., Frevert, C.W., Martin, T.R. & Matute-Bello, G. Depletion of resident alveolar macrophages does not prevent Fas-mediated lung injury in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **295**, L314-25 (2008).
17. Bergsbaken, T., Fink, S.L. & Cookson, B.T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology* **7**, 99–109 (2009).
18. Bernard, G.R., Artigas, A., Brigham, K.L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., Lamy, M., Legall, J.R., Morris, A. & Spragg, R. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee. *Intensive care medicine* **20**, 225–232 (1994).
19. Bertheloot, D. & Latz, E. HMGB1, IL-1alpha, IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cellular & molecular immunology* (2016).
20. Bonds, B.W., Yang, S., Hu, P.F., Kalpakis, K., Stansbury, L.G., Scalea, T.M. & Stein, D.M. Predicting secondary insults after severe traumatic brain injury. *The journal of trauma and acute care surgery* **79**, 85-90; discussion 90 (2015).
21. Bone, R.C., Sibbald, W.J. & Sprung, C.L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* **101**, 1481–1483 (1992).
22. Bonilla, W.V., Fröhlich, A., Senn, K., Kallert, S., Fernandez, M., Johnson, S., Kreutzfeldt, M., Hegazy, A.N., Schrick, C., Fallon, P.G., Klemenz, R., Nakae, S., Adler, H., Merkler, D., Löhning, M. & Pinschewer, D.D. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8⁺ T cell responses. *Science (New York, N.Y.)* **335**, 984–989 (2012).
23. Boyd, A.D. & Glassman, L.R. Trauma to the lung. *Chest surgery clinics of North America* **7**, 263–284 (1997).
24. Brouckaert, G., Kalai, M., Krysko, D.V., Saelens, X., Vercammen, D., Ndlovu, M.N., Ndlovu, '., Haegeman, G., D'Herde, K. & Vandenabeele, P. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Molecular biology of the cell* **15**, 1089–1100 (2004).
25. Brown, K.A., Brain, S.D., Pearson, J.D., Edgeworth, J.D., Lewis, S.M. & Treacher, D.F. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* **368**, 157–169 (2006).
26. Brun-Buisson, C., Minelli, C., Bertolini, G., Brazzi, L., Pimentel, J., Lewandowski, K., Bion, J., Romand, J.-A., Villar, J., Thorsteinsson, A., Damas, P., Armaganidis, A. & Lemaire, F. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive care medicine* **30**, 51–61 (2004).
27. Bruns, B., Honle, T., Kellermann, P., Ayala, A. & Perl, M. Divergent Effects of Neutrophils on Fas-Induced Pulmonary Inflammation, Apoptosis, and Lung Damage. *Shock (Augusta, Ga.)* (2016).
28. Candia, P. de, Rosa, V. de, Casiraghi, M. & Matarese, G. Extracellular RNAs: A Secret Arm of Immune System Regulation. *The Journal of biological chemistry* **291**, 7221–7228 (2016).
29. Caudrillier, A., Kessenbrock, K., Gilliss, B.M., Nguyen, J.X., Marques, M.B., Monestier, M., Toy, P., Werb, Z. & Looney, M.R. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *The Journal of clinical investigation* **122**, 2661–2671 (2012).
30. Cavaillon, J.-M. & Annane, D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *Journal of endotoxin research* **12**, 151–170 (2006).
31. Christensen, P.J., Du, M., Moore, B., Morris, S., Toews, G.B. & Paine, R. Expression and functional implications of CCR2 expression on murine alveolar epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **286**, L68-72

- (2004).
32. Cocco, R.E. & Ucker, D.S. Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure. *Molecular biology of the cell* **12**, 919–930 (2001).
 33. Cohen, P.L., Caricchio, R., Abraham, V., Camenisch, T.D., Jennette, J.C., Roubey, Robert A S, Earp, H.S., Matsushima, G. & Reap, E.A. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *The Journal of experimental medicine* **196**, 135–140 (2002).
 34. Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. & Olson, M.F. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature cell biology* **3**, 339–345 (2001).
 35. Conway Morris, A., Kefala, K., Wilkinson, T.S., Dhaliwal, K., Farrell, L., Walsh, T., Mackenzie, S.J., Reid, H., Davidson, D.J., Haslett, C., Rossi, A.G., Sallenave, J.-M. & Simpson, A.J. C5a mediates peripheral blood neutrophil dysfunction in critically ill patients. *American journal of respiratory and critical care medicine* **180**, 19–28 (2009).
 36. Cox, G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *The American journal of physiology* **271**, L566-71 (1996).
 37. Crestani, B., Cornillet, P., Dehoux, M., Rolland, C., Guenounou, M. & Aubier, M. Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo. Regulation by alveolar macrophage secretory products. *The Journal of clinical investigation* **94**, 731–740 (1994).
 38. Czermak, B.J., Breckwoldt, M., Ravage, Z.B., Huber-Lang, M., Schmal, H., Bless, N.M., Friedl, H.P. & Ward, P.A. Mechanisms of enhanced lung injury during sepsis. *The American journal of pathology* **154**, 1057–1065 (1999).
 39. De Paepe, Monique E, Mao, Q., Chao, Y., Powell, J.L., Rubin, L.P. & Sharma, S. Hyperoxia-induced apoptosis and Fas/FasL expression in lung epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **289**, L647-59 (2005).
 40. De Paepe, Monique E, Mao, Q. & Luks, F.I. Expression of apoptosis-related genes after fetal tracheal occlusion in rabbits. *Journal of pediatric surgery* **39**, 1616–1625 (2004).
 41. Deutschman, C.S. & Tracey, K.J. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* **40**, 463–475 (2014).
 42. Duprez, L., Takahashi, N., van Hauwermeiren, F., Vandendriessche, B., Goossens, V., Vanden Berghe, T., Declercq, W., Libert, C., Cauwels, A. & Vandenaabeele, P. RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity* **35**, 908–918 (2011).
 43. Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J.J., Harden, T.K., Leitinger, N. & Ravichandran, K.S. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **461**, 282–286 (2009).
 44. Engel, C., Brunkhorst, F.M., Bone, H.-G., Brunkhorst, R., Gerlach, H., Grond, S., Gruendling, M., Huhle, G., Jaschinski, U., John, S., Mayer, K., Oppert, M., Olthoff, D., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Stuber, F., Weiler, N., Welte, T., Bogatsch, H., Hartog, C., Loeffler, M. & Reinhart, K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive care medicine* **33**, 606–618 (2007).
 45. Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L. & Henson, P.M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell death and differentiation* **5**, 551–562 (1998).
 46. Fadok, V.A., Bratton, D.L., Guthrie, L. & Henson, P.M. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *Journal of*

- immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **166**, 6847–6854 (2001).
47. Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y. & Henson, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of clinical investigation* **101**, 890–898 (1998).
 48. Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A. & Henson, P.M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85–90 (2000).
 49. Fadok, V.A., McDonald, P.P., Bratton, D.L. & Henson, P.M. Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. *Biochemical Society transactions* **26**, 653–656 (1998).
 50. Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A. & Henson, P.M. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **149**, 4029–4035 (1992).
 51. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. & Henson, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **148**, 2207–2216 (1992).
 52. Farnand, A.W., Eastman, A.J., Herrero, R., Hanson, J.F., Mongovin, S., Altemeier, W.A. & Matute-Bello, G. Fas activation in alveolar epithelial cells induces KC (CXCL1) release by a MyD88-dependent mechanism. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **45**, 650–658 (2011).
 53. Fox, S., Leitch, A.E., Duffin, R., Haslett, C. & Rossi, A.G. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *Journal of innate immunity* **2**, 216–227 (2010).
 54. Frink, M., Hsieh, Y.-C., Hsieh, C.-H., Pape, H.-C., Choudhry, M.A., Schwacha, M.G. & Chaudry, I.H. Keratinocyte-derived chemokine plays a critical role in the induction of systemic inflammation and tissue damage after trauma-hemorrhage. *Shock (Augusta, Ga.)* **28**, 576–581 (2007).
 55. Gaip, U.S., Voll, R.E., Sheriff, A., Franz, S., Kalden, J.R. & Herrmann, M. Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews* **4**, 189–194 (2005).
 56. Galluzzi, L., Vicencio, J.M., Kepp, O., Tasdemir, E., Maiuri, M.C. & Kroemer, G. To die or not to die: that is the autophagic question. *Current molecular medicine* **8**, 78–91 (2008).
 57. Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.-A., Michalak, M. & Henson, P.M. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* **123**, 321–334 (2005).
 58. Garg, A.D., Krysko, D.V., Verfaillie, T., Kaczmarek, A., Ferreira, G.B., Marysael, T., Rubio, N., Firczuk, M., Mathieu, C., Roebroek, Anton J M, Annaert, W., Golab, J., Witte, P. de, Vandenabeele, P. & Agostinis, P. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *The EMBO journal* **31**, 1062–1079 (2012).
 59. Geroulanos, S. & Douka, E.T. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive care medicine* **32**, 2077 (2006).
 60. Ghosh, M.C., Makena, P.S., Gorantla, V., Sinclair, S.E. & Waters, C.M. CXCR4 regulates migration of lung alveolar epithelial cells through activation of Rac1 and matrix metalloproteinase-2. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **302**, L846-56 (2012).

61. Giannoudis, P.V. & Pape, H.C. Trauma and immune reactivity: too much, or too little immune response? *Injury* **38**, 1333–1335 (2007).
62. Goodman, E.R., Stricker, P., Velavicius, M., Fonseca, R., Kleinstein, E., Lavery, R., Deitch, E.A., Hauser, C.J. & Simms, H.H. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor in the genesis of acute respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* **134**, 1049–1054 (1999).
63. Gu, N., Kang, G., Jin, C., Xu, Y., Zhang, Z., Erle, D.J. & Zhen, G. Intelectin is required for IL-13-induced monocyte chemotactic protein-1 and -3 expression in lung epithelial cells and promotes allergic airway inflammation. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **298**, L290-6 (2010).
64. Guthrie, L.A., McPhail, L.C., Henson, P.M. & Johnston, R.B. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *The Journal of experimental medicine* **160**, 1656–1671 (1984).
65. Hagimoto, N., Kuwano, K., Kawasaki, M., Yoshimi, M., Kaneko, Y., Kunitake, R., Maeyama, T., Tanaka, T. & Hara, N. Induction of interleukin-8 secretion and apoptosis in bronchiolar epithelial cells by Fas ligation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **21**, 436–445 (1999).
66. Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y. & Nagata, S. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)* **304**, 1147–1150 (2004).
67. Hanley, P.J., Musset, B., Renigunta, V., Limberg, S.H., Dalpke, A.H., Sus, R., Heeg, K.M., Preisig-Müller, R. & Daut, J. Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9479–9484 (2004).
68. Hawryluk, G.W.J. & Bullock, M.R. Past, Present, and Future of Traumatic Brain Injury Research. *Neurosurgery clinics of North America* **27**, 375–396 (2016).
69. Henson, P.M. & Tuder, R.M. Apoptosis in the lung: induction, clearance and detection. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **294**, L601-11 (2008).
70. Hierholzer, C., Kalff, J.C., Omert, L., Tsukada, K., Loeffert, J.E., Watkins, S.C., Billiar, T.R. & Tweardy, D.J. Interleukin-6 production in hemorrhagic shock is accompanied by neutrophil recruitment and lung injury. *The American journal of physiology* **275**, L611-21 (1998).
71. Hietbrink, F., Koenderman, L., Rijkers, G. & Leenen, L. Trauma: the role of the innate immune system. *World journal of emergency surgery: WJES* **1**, 15 (2006).
72. Hiramatsu, M., Hotchkiss, R.S., Karl, I.E. & Buchman, T.G. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock (Augusta, Ga.)* **7**, 247–253 (1997).
73. Hoffmann, P.R., deCathelineau, A.M., Ogden, C.A., Leverrier, Y., Bratton, D.L., Daleke, D.L., Ridley, A.J., Fadok, V.A. & Henson, P.M. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *The Journal of cell biology* **155**, 649–659 (2001).
74. Hotchkiss, R.S., Chang, K.C., Grayson, M.H., Tinsley, K.W., Dunne, B.S., Davis, C.G., Osborne, D.F. & Karl, I.E. Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6724–6729 (2003).
75. Hotchkiss, R.S., Monneret, G. & Payen, D. Immunosuppression in sepsis: a novel

- understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet. Infectious diseases* **13**, 260–268 (2013).
76. Hoth, J.J., Wells, J.D., Hiltbold, E.M., McCall, C.E. & Yoza, B.K. Mechanism of neutrophil recruitment to the lung after pulmonary contusion. *Shock (Augusta, Ga.)* **35**, 604–609 (2011).
 77. Hu, Y., Liu, J., Wu, Y.-F., Lou, J., Mao, Y.-Y., Shen, H.-H. & Chen, Z.-H. mTOR and autophagy in regulation of acute lung injury: a review and perspective. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **16**, 727–734 (2014).
 78. Huang, S., Paulauskis, J.D., Godleski, J.J. & Kobzik, L. Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. *The American journal of pathology* **141**, 981–988 (1992).
 79. Hubbard, W.J., Bland, K.I. & Chaudry, I.H. The role of the mitochondrion in trauma and shock. *Shock (Augusta, Ga.)* **22**, 395–402 (2004).
 80. Huo, Y., Weber, C., Forlow, S.B., Sperandio, M., Thatte, J., Mack, M., Jung, S., Littman, D.R. & Ley, K. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. *The Journal of clinical investigation* **108**, 1307–1314 (2001).
 81. Huynh, M.-L.N., Fadok, V.A. & Henson, P.M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *The Journal of clinical investigation* **109**, 41–50 (2002).
 82. Jaffin, J.H., McKinney, L., Kinney, R.C., Cunningham, J.A., Moritz, D.M., Kraimer, J.M., Graeber, G.M., Moe, J.B., Salander, J.M. & Harmon, J.W. A laboratory model for studying blast overpressure injury. *The Journal of trauma* **27**, 349–356 (1987).
 83. Jahresbericht Traumaregister DGU 2014. Available at <http://www.bing.com/search?q=jahresbericht+traumregister+dgu+2014&pc=MOZI&form=MOZSBR> [letzter Zugriff am 05.07.2017].
 84. Joven, J., Guirro, M., Marine-Casado, R., Rodriguez-Gallego, E. & Menendez, J.A. Autophagy is an inflammation-related defensive mechanism against disease. *Advances in experimental medicine and biology* **824**, 43–59 (2014).
 85. Kato, A., Okura, T., Hamada, C., Miyoshi, S., Katayama, H., Higaki, J. & Ito, R. Cell stress induces upregulation of osteopontin via the ERK pathway in type II alveolar epithelial cells. *PloS one* **9**, e100106 (2014).
 86. Kaukonen, K.-M., Bailey, M., Suzuki, S., Pilcher, D. & Bellomo, R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* **311**, 1308–1316 (2014).
 87. Kawasaki, M., Kuwano, K., Hagimoto, N., Matsuba, T., Kunitake, R., Tanaka, T., Maeyama, T. & Hara, N. Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. *The American journal of pathology* **157**, 597–603 (2000).
 88. Keel, M., Ungethüm, U., Steckholzer, U., Niederer, E., Hartung, T., Trentz, O. & Ertel, W. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* **90**, 3356–3363 (1997).
 89. Kim, J.Y., Park, J.S., Strassheim, D., Douglas, I., Diaz del Valle, Fernando, Asehnoune, K., Mitra, S., Kwak, S.H., Yamada, S., Maruyama, I., Ishizaka, A. & Abraham, E. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **288**, L958-65 (2005).
 90. Kim, Y.K., Lee, E.K., Kang, J.K., Kim, J.A., You, J.-S., Park, J.H., Seo, D.-W., Hwang, J.W., Kim, S.-N., Lee, H.Y., Lee, H.W. & Han, J.-W. Activation of NF-kappaB by HDAC inhibitor apicidin through Sp1-dependent de novo protein synthesis: its implication for resistance to apoptosis. *Cell death and differentiation* **13**, 2033–2041

- (2006).
91. Kissoon, N., Carcillo, J.A., Espinosa, V., Argent, A., Devictor, D., Madden, M., Singhi, S., van der Voort, Edwin & Latour, J. World Federation of Pediatric Intensive Care and Critical Care Societies: Global Sepsis Initiative. *Pediatric critical care medicine: a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* **12**, 494–503 (2011).
 92. Knöferl, M.W., Liener, U.C., Seitz, D.H., Perl, M., Brückner, U.B., Kinzl, L. & Gebhard, F. Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock (Augusta, Ga.)* **19**, 519–525 (2003).
 93. Kobayashi, Y. Neutrophil biology: an update. *EXCLI journal* **14**, 220–227 (2015).
 94. Kono, H. & Rock, K.L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature reviews. Immunology* **8**, 279–289 (2008).
 95. Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O. & Zitvogel, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual review of immunology* **31**, 51–72 (2013).
 96. Lafe, M.D., Simon, R.H., Flint, A. & Keller, J.B. Adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *The American journal of medicine* **80**, 1022–1026 (1986).
 97. Lee, A., Whyte, M.K. & Haslett, C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *Journal of leukocyte biology* **54**, 283–288 (1993).
 98. Lee, S., Lee, S.-J., Coronata, A.A., Fredenburgh, L.E., Chung, S.W., Perrella, M.A., Nakahira, K., Ryter, S.W. & Choi, Augustine M K. Carbon monoxide confers protection in sepsis by enhancing beclin 1-dependent autophagy and phagocytosis. *Antioxidants & redox signaling* **20**, 432–442 (2014).
 99. Lenz, A., Franklin, G.A. & Cheadle, W.G. Systemic inflammation after trauma. *Injury* **38**, 1336–1345 (2007).
 100. Liener, U.C., Knöferl, M.W., Sträter, J., Barth, Thomas F E, Pauser, E.-M., Nüssler, A.K., Kinzl, L., Brückner, U.B. & Gebhard, F. Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock (Augusta, Ga.)* **20**, 511–516 (2003).
 101. Lingappan, K., Jiang, W., Wang, L., Couroucli, X.I., Barrios, R. & Moorthy, B. Sex-specific differences in hyperoxic lung injury in mice: implications for acute and chronic lung disease in humans. *Toxicology and applied pharmacology* **272**, 281–290 (2013).
 102. Liu, Y. & Levine, B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell death and differentiation* **22**, 367–376 (2015).
 103. Lomas-Neira, J., Chung, C.-S., Perl, M., Gregory, S., Biffl, W. & Ayala, A. Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **290**, L51-8 (2006).
 104. Lomas-Neira, J., Perl, M., Venet, F., Chung, C.-S. & Ayala, A. The role and source of tumor necrosis factor- α in hemorrhage-induced priming for septic lung injury. *Shock (Augusta, Ga.)* **37**, 611–620 (2012).
 105. Luhr, O.R., Antonsen, K., Karlsson, M., Aardal, S., Thorsteinsson, A., Frostell, C.G. & Bonde, J. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *American journal of respiratory and critical care medicine* **159**, 1849–1861 (1999).
 106. Mak, I.W., Evaniew, N. & Ghert, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *American journal of translational research* **6**, 114–118 (2014).
 107. Matthay, M.A., Zimmerman, G.A., Esmon, C., Bhattacharya, J., Collier, B., Doerschuk, C.M., Floros, J., Gimbrone, M.A., Hoffman, E., Hubmayr, R.D., Leppert, M., Matalon, S., Munford, R., Parsons, P., Slutsky, A.S., Tracey, K.J., Ward, P., Gail,

- D.B. & Harabin, A.L. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *American journal of respiratory and critical care medicine* **167**, 1027–1035 (2003).
108. Matute-Bello, G., Liles, W.C., Steinberg, K.P., Kiener, P.A., Mongovin, S., Chi, E.Y., Jonas, M. & Martin, T.R. Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **163**, 2217–2225 (1999).
109. Maus, U., Herold, S., Muth, H., Maus, R., Ermert, L., Ermert, M., Weissmann, N., Rosseau, S., Seeger, W., Grimminger, F. & Lohmeyer, J. Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **280**, L58-68 (2001).
110. McDonald, P.P., Fadok, V.A., Bratton, D. & Henson, P.M. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **163**, 6164–6172 (1999).
111. Messer, M.P., Kellermann, P., Weber, S.J., Hohmann, C., Denk, S., Klohs, B., Schultze, A., Braumüller, S., Huber-Lang, M.S. & Perl, M. Silencing of fas, fas-associated via death domain, or caspase 3 differentially affects lung inflammation, apoptosis, and development of trauma-induced septic acute lung injury. *Shock (Augusta, Ga.)* **39**, 19–27 (2013).
112. Mevorach, D., Zhou, J.L., Song, X. & Elkou, K.B. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *The Journal of experimental medicine* **188**, 387–392 (1998).
113. Miller, P.R., Croce, M.A., Bee, T.K., Qaisi, W.G., Smith, C.P., Collins, G.L. & Fabian, T.C. ARDS after pulmonary contusion: accurate measurement of contusion volume identifies high-risk patients. *The Journal of trauma* **51**, 223-8; discussion 229-30 (2001).
114. Mitchell, D.A., Pickering, M.C., Warren, J., Fossati-Jimack, L., Cortes-Hernandez, J., Cook, H.T., Botto, M. & Walport, M.J. C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **168**, 2538–2543 (2002).
115. Monchi, M., Bellenfant, F., Cariou, A., Joly, L.M., Thebert, D., Laurent, I., Dhainaut, J.F. & Brunet, F. Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **158**, 1076–1081 (1998).
116. Morris, A.C., Brittan, M., Wilkinson, T.S., McAuley, D.F., Antonelli, J., McCulloch, C., Barr, L.C., McDonald, N.A., Dhaliwal, K., Jones, R.O., Mackellar, A., Haslett, C., Hay, A.W., Swann, D.G., Anderson, N., Laurenson, I.F., Davidson, D.J., Rossi, A.G., Walsh, T.S. & Simpson, A.J. C5a-mediated neutrophil dysfunction is RhoA-dependent and predicts infection in critically ill patients. *Blood* **117**, 5178–5188 (2011).
117. Mouded, M., Egea, E.E., Brown, M.J., Hanlon, S.M., Houghton, A.M., Tsai, L.W., Ingenito, E.P. & Shapiro, S.D. Epithelial cell apoptosis causes acute lung injury masquerading as emphysema. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **41**, 407–414 (2009).
118. Munoz, L.E., Franz, S., Pausch, F., Fürnrohr, B., Sheriff, A., Vogt, B., Kern, P.M., Baum, W., Stach, C., Laer, D. von, Brachvogel, B., Poschl, E., Herrmann, M. & Gaipl, U.S. The influence on the immunomodulatory effects of dying and dead cells of Annexin V. *Journal of leukocyte biology* **81**, 6–14 (2007).
119. Nagata, S., Hanayama, R. & Kawane, K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* **140**, 619–630 (2010).

120. Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Métivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccosanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature medicine* **13**, 54–61 (2007).
121. Odom, D.T., Dowell, R.D., Jacobsen, E.S., Gordon, W., Danford, T.W., MacIsaac, K.D., Rolfe, P.A., Conboy, C.M., Gifford, D.K. & Fraenkel, E. Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nature genetics* **39**, 730–732 (2007).
122. Patel, V.A., Longacre, A., Hsiao, K., Fan, H., Meng, F., Mitchell, J.E., Rauch, J., Ucker, D.S. & Levine, J.S. Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those triggered by necrotic cells: Implications for the delayed clearance model of autoimmunity. *The Journal of biological chemistry* **281**, 4663–4670 (2006).
123. Pepe, P.E., Potkin, R.T., Reus, D.H., Hudson, L.D. & Carrico, C.J. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. *American journal of surgery* **144**, 124–130 (1982).
124. Perl, M., Chung, C.-S., Perl, U., Lomas-Neira, J., Paepe, M. de, Cioffi, W.G. & Ayala, A. Fas-induced pulmonary apoptosis and inflammation during indirect acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* **176**, 591–601 (2007).
125. Perl, M., Chung, C.-S., Perl, U., Thakkar, R., Lomas-Neira, J. & Ayala, A. Therapeutic accessibility of caspase-mediated cell death as a key pathomechanism in indirect acute lung injury. *Critical care medicine* **38**, 1179–1186 (2010).
126. Perl, M., Gebhard, F., Knöferl, M.W., Bachem, M., Gross, H.-J., Kinzl, L. & Strecker, W. The pattern of preformed cytokines in tissues frequently affected by blunt trauma. *Shock (Augusta, Ga.)* **19**, 299–304 (2003).
127. Perl, M., Hohmann, C., Denk, S., Kellermann, P., Lu, D., Braumüller, S., Bachem, M.G., Thomas, J., Knöferl, M.W., Ayala, A., Gebhard, F. & Huber-Lang, M.S. Role of activated neutrophils in chest trauma-induced septic acute lung injury. *Shock (Augusta, Ga.)* **38**, 98–106 (2012).
128. Perl, M., Kieninger, M., Huber-Lang, M.S., Gross, H.-J., Bachem, M.G., Braumüller, S., Gebhard, F., Ayala, A. & Knöferl, M.W. Divergent effects of activated neutrophils on inflammation, Kupffer cell/splenocyte activation, and lung injury following blunt chest trauma. *Shock (Augusta, Ga.)* **37**, 210–218 (2012).
129. Perl, M., Lomas-Neira, J., Chung, C.-S. & Ayala, A. Epithelial cell apoptosis and neutrophil recruitment in acute lung injury—a unifying hypothesis? What we have learned from small interfering RNAs. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **14**, 465–475 (2008).
130. Perl, M., Lomas-Neira, J., Venet, F., Chung, C.-S. & Ayala, A. Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. *Expert review of respiratory medicine* **5**, 115–126 (2011).
131. Perner, A., Gordon, A.C., Backer, D. de, Dimopoulos, G., Russell, J.A., Lipman, J., Jensen, J.-U., Myburgh, J., Singer, M., Bellomo, R. & Walsh, T. Sepsis: frontiers in diagnosis, resuscitation and antibiotic therapy. *Intensive care medicine* (2016).
132. Peter, C., Waibel, M., Radu, C.G., Yang, L.V., Witte, O.N., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. & Lauber, K. Migration to apoptotic "find-me" signals is mediated via the phagocyte receptor G2A. *The Journal of biological chemistry* **283**, 5296–5305 (2008).
133. Peter, C., Wesselborg, S., Herrmann, M. & Lauber, K. Dangerous attraction: phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells. *Apoptosis: an*

- international journal on programmed cell death* **15**, 1007–1028 (2010).
134. Philpott, N.J., Turner, A.J., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J.C., Gordon-Smith, E.C., Dalglish, A.G. & Gibson, F.M. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* **87**, 2244–2251 (1996).
135. Poon, Ivan K H, Lucas, C.D., Rossi, A.G. & Ravichandran, K.S. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature reviews. Immunology* **14**, 166–180 (2014).
136. Proudfoot, A.G., McAuley, D.F., Griffiths, Mark J D & Hind, M. Human models of acute lung injury. *Disease models & mechanisms* **4**, 145–153 (2011).
137. Pruenster, M., Mudde, L., Bombosi, P., Dimitrova, S., Zsak, M., Middleton, J., Richmond, A., Graham, G.J., Segerer, S., Nibbs, Robert J B & Rot, A. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nature immunology* **10**, 101–108 (2009).
138. Ranieri, V.M., Rubenfeld, G.D., Thompson, B.T., Ferguson, N.D., Caldwell, E., Fan, E., Camporota, L. & Slutsky, A.S. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* **307**, 2526–2533 (2012).
139. Ren, Y., Stuart, L., Lindberg, F.P., Rosenkranz, A.R., Chen, Y., Mayadas, T.N. & Savill, J. Nonphlogistic clearance of late apoptotic neutrophils by macrophages: efficient phagocytosis independent of beta 2 integrins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, 4743–4750 (2001).
140. Rhrissorrakrai, K., Belcastro, V., Bilal, E., Norel, R., Poussin, C., Mathis, C., Dulize, R.H.J., Ivanov, N.V., Alexopoulos, L., Rice, J.J., Peitsch, M.C., Stolovitzky, G., Meyer, P. & Hoeng, J. Understanding the limits of animal models as predictors of human biology: lessons learned from the sbv IMPROVER Species Translation Challenge. *Bioinformatics (Oxford, England)* **31**, 471–483 (2015).
141. Rock, K.L., Lai, J.-J. & Kono, H. Innate and adaptive immune responses to cell death. *Immunological reviews* **243**, 191–205 (2011).
142. Rubenfeld, G.D. Epidemiology of acute lung injury. *Critical care medicine* **31**, S276–84 (2003).
143. Rubenfeld, G.D., Caldwell, E., Peabody, E., Weaver, J., Martin, D.P., Neff, M., Stern, E.J. & Hudson, L.D. Incidence and outcomes of acute lung injury. *The New England journal of medicine* **353**, 1685–1693 (2005).
144. Ryter, S.W., Mizumura, K. & Choi, Augustine M K. The impact of autophagy on cell death modalities. *International journal of cell biology* **2014**, 502676 (2014).
145. Ryter, S.W., Nakahira, K., Haspel, J.A. & Choi, Augustine M K. Autophagy in pulmonary diseases. *Annual review of physiology* **74**, 377–401 (2012).
146. Sadik, C.D., Kim, N.D. & Luster, A.D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in immunology* **32**, 452–460 (2011).
147. Sakran, J.V., Greer, S.E., Werlin, E. & McCunn, M. Care of the injured worldwide: trauma still the neglected disease of modern society. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine* **20**, 64 (2012).
148. Sauter, B., Albert, M.L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S. & Bhardwaj, N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **191**, 423–434 (2000).
149. Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191–195 (2002).
150. Schutte, B., Nuydens, R., Geerts, H. & Ramaekers, F. Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *Journal of neuroscience methods* **86**, 63–69 (1998).

151. Schwulst, S.J., Davis, C.G., Coopersmith, C.M. & Hotchkiss, R.S. Adoptive transfer of dying cells causes bystander-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* **353**, 780–785 (2007).
152. Scott, R.S., McMahon, E.J., Pop, S.M., Reap, E.A., Caricchio, R., Cohen, P.L., Earp, H.S. & Matsushima, G.K. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* **411**, 207–211 (2001).
153. Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J. & Bréard, J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature cell biology* **3**, 346–352 (2001).
154. Seitz, D.H., Niesler, U., Palmer, A., Sulger, M., Braumüller, S.T., Perl, M., Gebhard, F. & Knöferl, M.W. Blunt chest trauma induces mediator-dependent monocyte migration to the lung. *Critical care medicine* **38**, 1852–1859 (2010).
155. Seitz, D.H., Palmer, A., Niesler, U., Fröba, J.S., Heidemann, V., Rittlinger, A., Braumüller, S.T., Zhou, S., Gebhard, F. & Knöferl, M.W. Alveolar macrophage phagocytosis is enhanced after blunt chest trauma and alters the posttraumatic mediator release. *Shock (Augusta, Ga.)* **36**, 621–627 (2011).
156. Seitz, D.H., Perl, M., Mangold, S., Neddermann, A., Braumüller, S.T., Zhou, S., Bachem, M.G., Huber-Lang, M.S. & Knöferl, M.W. Pulmonary contusion induces alveolar type 2 epithelial cell apoptosis: role of alveolar macrophages and neutrophils. *Shock (Augusta, Ga.)* **30**, 537–544 (2008).
157. Semerad, C.L., Liu, F., Gregory, A.D., Stumpf, K. & Link, D.C. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* **17**, 413–423 (2002).
158. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. & Kumar, S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell death and differentiation* (2014).
159. Sharma, A.K., Fernandez, L.G., Awad, A.S., Kron, I.L. & Laubach, V.E. Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF-alpha during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **293**, L105-13 (2007).
160. Shi, Y., Evans, J.E. & Rock, K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* **425**, 516–521 (2003).
161. Sibille, Y. & Marchandise, F.X. Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. *The European respiratory journal* **6**, 1529–1543 (1993).
162. Skoberne, M., Beignon, A.S., Larsson, M. & Bhardwaj, N. Apoptotic cells at the crossroads of tolerance and immunity. *Current topics in microbiology and immunology* **289**, 259–292 (2005).
163. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* **150**, 76–85 (1985).
164. Somersan, S. & Bhardwaj, N. Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *The Journal of cell biology* **155**, 501–504 (2001).
165. Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M. & Chilvers, E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology* **31**, 318–324 (2010).
166. Surbatovic, M., Veljovic, M., Jevdjic, J., Popovic, N., Djordjevic, D. & Radakovic, S. Immunoinflammatory response in critically ill patients: severe sepsis and/or trauma. *Mediators of inflammation* **2013**, 362793 (2013).
167. Swank, D.W. & Moore, S.B. Roles of the neutrophil and other mediators in adult respiratory distress syndrome. *Mayo Clinic proceedings* **64**, 1118–1132 (1989).

168. Tanaka, A., Jin, Y., Lee, S.-J., Zhang, M., Kim, H.P., Stolz, D.B., Ryter, S.W. & Choi, Augustine M K. Hyperoxia-induced LC3B interacts with the Fas apoptotic pathway in epithelial cell death. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **46**, 507–514 (2012).
169. Taneja, R., Parodo, J., Jia, S.H., Kapus, A., Rotstein, O.D. & Marshall, J.C. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Critical care medicine* **32**, 1460–1469 (2004).
170. Tang, P.S., Mura, M., Seth, R. & Liu, M. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **294**, L632-41 (2008).
171. Terpstra, M.L., Aman, J., van Nieuw Amerongen, Geerten P & Groeneveld, A B Johan. Plasma biomarkers for acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis*. *Critical care medicine* **42**, 691–700 (2014).
172. Tolle, L.B. & Standiford, T.J. Danger-associated molecular patterns (DAMPs) in acute lung injury. *The Journal of pathology* **229**, 145–156 (2013).
173. Tomashefski, J.F. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clinics in chest medicine* **21**, 435–466 (2000).
174. Torr, E.E., Gardner, D.H., Thomas, L., Goodall, D.M., Bielemeier, A., Willetts, R., Griffiths, H.R., Marshall, L.J. & Devitt, A. Apoptotic cell-derived ICAM-3 promotes both macrophage chemoattraction to and tethering of apoptotic cells. *Cell death and differentiation* **19**, 671–679 (2012).
175. Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 700–714 (2010).
176. Vincent, J.-L. & Zambon, M. Why do patients who have acute lung injury/acute respiratory distress syndrome die from multiple organ dysfunction syndrome? Implications for management. *Clinics in chest medicine* **27**, 725-31; abstract x-xi (2006).
177. Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R. & Girkontaite, I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350–351 (1997).
178. Wadkins, R.M. & Jovin, T.M. Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochemistry* **30**, 9469–9478 (1991).
179. Wang, L., Scabilloni, J.F., Antonini, J.M., Rojanasakul, Y., Castranova, V. & Mercer, R.R. Induction of secondary apoptosis, inflammation, and lung fibrosis after intratracheal instillation of apoptotic cells in rats. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **290**, L695-L702 (2006).
180. Ware, J.H. Particulate air pollution and mortality--clearing the air. *The New England journal of medicine* **343**, 1798–1799 (2000).
181. Watanabe, K., Koizumi, F., Kurashige, Y., Tsurufuji, S. & Nakagawa, H. Rat CINC, a member of the interleukin-8 family, is a neutrophil-specific chemoattractant in vivo. *Experimental and molecular pathology* **55**, 30–37 (1991).
182. Weckbach, S., Hohmann, C., Denk, S., Kellermann, P., Huber-Lang, M.S., Baumann, B., Wirth, T., Gebhard, F., Bachem, M. & Perl, M. Apoptotic and inflammatory signaling via Fas and tumor necrosis factor receptor I contribute to the development of chest trauma-induced septic acute lung injury. *The journal of trauma and acute care surgery* **74**, 792–800 (2013).
183. Wikenheiser, K.A., Vorbroker, D.K., Rice, W.R., Clark, J.C., Bachurski, C.J., Oie, H.K. & Whitsett, J.A. Production of immortalized distal respiratory epithelial cell lines from surfactant protein C/simian virus 40 large tumor antigen transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**,

- 11029–11033 (1993).
184. Williams, M.R., Azcutia, V., Newton, G., Alcaide, P. & Luscinskas, F.W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends in immunology* **32**, 461–469 (2011).
185. Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, Brittney N V, Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., Malawista, S.E., de Boisfleury Chevance, Anne, Zhang, K., Conly, J. & Kubes, P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature medicine* **18**, 1386–1393 (2012).
186. Yoon, Y.-S., Kim, S.-Y., Kim, M.-J., Lim, J.-H., Cho, M.-S. & Kang, J.L. PPAR γ activation following apoptotic cell instillation promotes resolution of lung inflammation and fibrosis via regulation of efferocytosis and proresolving cytokines. *Mucosal Immunology* **8**, 1031–1046 (2015).
187. Zhao, J., He, D., Su, Y., Berdyshev, E., Chun, J., Natarajan, V. & Zhao, Y. Lysophosphatidic acid receptor 1 modulates lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar epithelial cells and murine lungs. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **301**, L547-56 (2011).

Anhang

Kurze Charakterisierung der in der Arbeit verwendeten murinen Epithelzelllinie MLE12

Die Murine Lungen Epithel Zelllinie-12 (MLE12) wurde im Jahr 1993 durch die Arbeitsgruppe um Kathryn Wikenheiser und Mitarbeiter isoliert. Es handelt sich dabei um Zellen des distalen bronchiolären und alveolärem Epitheliums, die aus Lungentumoren transgener Mäuse, die das große virale onkogene Affenvirus 40 Tumor Antigen unter transkriptionaler Kontrolle der Promotor Region des humanen Surfactant Protein C (SP-C) Gens (SV-40) tragen. Diese Zellen zeichnen sich durch schnelles Wachstum, fehlende Kontaktinhibition und eine in Kultur über 30-40 Passagen stabile epitheliale Zellmorphologie aus [183]. Darüber hinaus weisen sie, als ATII Zelllinie, typische Merkmale, wie die Ausbildung von Mikrovilli und zytoplasmatischer multivesikulärer Körperchen, auf. Weitere Charakteristika sind die Fähigkeit zur Expression von Surfactant (SP-B und SP-C) und die Fähigkeit zur Sekretion von Phospholipiden. Dabei werden in Folge von Stimulation durch DAMPs, wie ATP oder PMA, vor allem Phosphatidylcholin und Sphingomyelin sekretiert. Bis zur Passage 29 konnten durch Wikenheiser et al. keine tumorigenen Effekte der MLE12-Zellen nachgewiesen werden [183]. Kato et al. konnten zeigen, dass die Exposition von MLE12-Zellen gegenüber zellulärem Stress die ERK-Signalweg vermittelte Expression von Osteopontin induziert. Dabei wurden die Toxine Bleomycin, Doxorubicin und Tunicamycin als exogene Stressfaktoren verwendet. Osteopontin ist ein vielseitig funktionales Protein und spielt eine wichtige Rolle in Prozessen wie Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Gewebefibrose [85]. Die CXCL12-Sekretion durch MLE12-Zellen wurde in Folge von mechanischem Stress (durch Kratzverletzung) *in vitro* beobachtet. MLE12-Zellen exprimieren darüber hinaus den CXCL12 Rezeptor CXCR4 der die Heilung *in vitro* förderte [60]. Nach Stimulation mit IL-13 exprimieren MLE12-Zellen vermittelt über Intelectin MCP-1 [63]. Nach Stimulation mit LPS konnte im Kulturüberstand der MLE12-Zellen IL-6 nachgewiesen werden [187]. Das bedeutet, dass die Zellen bei Vorhandensein eines entsprechenden exogenen Reizes in der Lage sind IL-6 zu exprimieren und zu sekretieren. De Paepe et al. wiesen nach, dass Hypoxie die Expression von Fas/FasL durch MLE12-Zellen induziert und durch Kontakt mit dem FasL CD95 (Jo2) Apoptose ausgelöst werden kann [39],[40]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte weiterführend zeigen, dass die Exposition von MLE12-Zellen mit CD95 zu einer MyD88 abhängigen gesteigerten Expression von KC führte [16],[52].

Tab. 6: Strahlendosis der zur Apoptose-Induktion verwendeten UV-C Lichtquelle

Messpunkt	Min./Max. (J/m ²)	Momentandosis (J/m ²)	Dosis/min (J/m ²)	Messdauer in sec.
Mitte	1,782	2,271	0,127	60
	2,270			
Rechts	1,773	1,791	0,112	60
	1,802			
Links	1,794	1,825	0,111	60
	1,826			
Nach 5 Min. Dauerbetrieb (während Betrieb)				
Mitte	2,411	2,429	0,148	60
	2,431			
Rechts	1,874	1,881	0,115	60
	1,886			
Links	1,851	1,858	0,114	60
	1,865			
Nach ca. 10 Min. Dauerbetrieb (während Betrieb)				
Mitte	2,401	2,413	0,148	60
	2,425			
Rechts	1,839	1,854	0,112	60
	1,850			
Links	1,828	1,877	0,108	60
	1,879			

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung verschiedener Personen nicht möglich gewesen. So danke ich insbesondere meiner Familie für die fortwährende Unterstützung über all die Jahre, die diese Arbeit nun schon in Anspruch genommen hat. Ich danke dabei zuallererst meinen Eltern, auf deren Unterstützung ich stets setzen konnte. Auch meinen Schwestern gebührt Dank, da mir auch Ihre Hilfe in den letzten Jahren sehr wichtig war.

Gerade was den wissenschaftlichen Aspekt dieser Dissertation betrifft, danke ich in erster Linie meinem Doktorvater für das Vertrauen mich am Projekt des Emmy-Nöther-Antrags mitarbeiten zu lassen. Gerade auch für die Erfahrungen im persönlichen Austausch, der Ermöglichung des Kongressbesuchs und der Vernetzung im unmittelbaren Forschungsumfeld an der Uni Ulm und darüber hinaus, gebührt ihm der größte Dank.

Die Arbeit im Labor am Safranberg und später auf dem Eselsberg wäre ohne den täglichen Austausch mit den verschiedenen Arbeitsgruppen, insbesondere des Traumalabors nicht denkbar gewesen. So danke ich den MTAs, ohne deren tägliche praktische wie auch moralische Unterstützung diese Arbeit, aber auch der Laboralltag nicht erbaulich gewesen wäre.

Schließlich gilt meinen Co-Promovenden wie auch den medizinischen Doktoranden meiner Arbeitsgruppe, die in einer Vielzahl von Diskussionen und auch mit praktischer Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Im Laufe der Jahre waren Sie stets wechselnde Begleiter und haben so die Forschungsarbeit bereichert, den Alltag belebt und meinen Horizont erweitert.

Last but not least danke ich der Leitung der Klinik für Unfallchirurgie, die durch Labor- und Klinikneubauten am Eselsberg eine hervorragende Forschungsumgebung und die besten Voraussetzungen für eine erfolgreiche Forschung etabliert haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name, Vorname Hohmann, Christoph
Geburtsdatum und -Ort 1984 in Eisenach
Nationalität deutsch

Ausbildung

08/2017- heute Referendariat am Martin-Luther-Gymnasium Hartha

10/2013 – 04/2017 **Studium des Lehramts für Gymnasium** (Neues Staatsexamen)
Deutsch und Gemeinschaftskunde/Wirtschaftslehre/Rechtslehre
Universität Leipzig (Note 2,1)

06/2009 – 03/2013 **Promotion**
Klinik für Unfallchirurgie, Ulm
Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Biomedizinische Forschung (ZBF)
Helmholtzstraße 8/2
89081 Ulm

Thema der Dissertation:
*„Einfluss der Apoptose auf die Inflammation der Lunge im
Rahmen der akuten septischen Lungenschädigung“*

11/2008 - 05/2009 arbeitsuchend; Tätigkeit als Nachhilfelehrer im Fach Mathematik
(Gymnasium)

10/2003 - 10/2008 **Studium der Biologie** (Note 1,6)
Philipps-Universität, Marburg

Titel der Diplomarbeit:
*„Analysen um HI, CG4691, CG31861 und CG32308 bezüglich
ihrer Expression und Bedeutung für die Spermatogenese in
Drosophila melanogaster“* (Note 1,7)

05/2003 – 09/2003 Praktika in der Industrie

07/2002 - 04/2003 Grundwehrdienst beim Stabs- und Fernmeldebataillon 701,
Leipzig

06/2002 **Abitur** (Note 1,6)
Ernst-Abbe-Gymnasium, Eisenach

Weiterbildung

07/2009 Kurs zur experimentellen Tierarbeit, Heidelberg
(Zertifikat nach FELASA B)

Publikationen

- 06/2014 *Effects of combined silencing of Caspase-3, FADD and FAS on the pathogenesis of chest trauma-induced septic acute lung injury (ALI).*
Hohmann C, Kellermann P, Weber S, Schaupp F, Huber-Lang M, Perl M.; Poster 37th Annual Conference on Shock, Charlotte/NC, USA
- Divergent effects of necrotic and apoptotic lung epithelial cells in the pathogenesis of chest trauma-induced septic acute lung injury (ALI).*
Hohmann C, Kellermann P, Schultze A, Klohs B, Huber-Lang M, Perl M.; Poster 37th Annual Conference on Shock, Charlotte/NC, USA
- 03/2013 *Apoptotic and inflammatory signaling via Fas and tumor necrosis factor receptor 1 contribute to the development of chest trauma-induced septic acute lung injury.*
Weckbach S, **Hohmann C**, Denk S, Kellermann P, Huber-Lang MS, Baumann B, Wirth T, Gebhard F, Bachem M, Perl M.
J Trauma Acute Care Surg. 2013 Mar; 74(3):792-800.
- 02/2013 *Inflammatory and apoptotic alterations in serum and injured tissue after experimental polytrauma in mice: Distinct early response compared with single trauma or "double-hit" injury.*
Weckbach S, **Hohmann C**, Braumueller S, Denk S, Klohs B, Stahel PF, Gebhard F, Huber-Lang MS, Perl M.
J Trauma Acute Care Surg. 2013 Feb; 74(2):489-98.
- 01/2013 *Silencing of fas, fas-associated via death domain, or caspase 3 differentially affects lung inflammation, apoptosis, and development of trauma-induced septic acute lung injury.*
Messer MP, Kellermann P, Weber SJ, **Hohmann C**, Denk S, Klohs B, Schultze A, Braumüller S, Huber-Lang MS, Perl M.
Shock. 2013 Jan; 39(1):19-27.
- 07/2012 *Role of activated neutrophils in chest trauma-induced septic acute lung injury.*
Perl M, **Hohmann C**, Denk S, Kellermann P, Lu D, Braumüller S, Bachem MG, Thomas J, Knöferl MW, Ayala A, Gebhard F, Huber-Lang MS. Shock. 2012 Jul;38(1):98-106.

Leipzig, den 27.11.2018