

Zentrum für Chirurgie
Klinik für Unfallchirurgie, Hand-,
Plastische und Wiederherstellungschirurgie
der Universität Ulm
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Florian Gebhard

**Apoptose von Alveolar Typ II Epithelzellen nach
stumpfem Thoraxtrauma –
Rolle der Alveolarmakrophagen**

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

Vorgelegt von
STEFANIE MANGOLD
aus Wangen
2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Knöferl
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Bachem
Tag der Promotion: 16.07.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung des Thoraxtraumas	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Prognose	1
1.2	Pathologische Grundlagen des Thoraxtraumas	2
1.2.1	Histologische Veränderungen	2
1.2.2	Pathophysiologie der Lungenkontusion	2
1.2.3	Inflammatorische Veränderungen	3
1.3	Apoptose von Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen)	3
1.3.1	Alveolarepithel	4
1.3.2	Allgemeiner Ablauf der Apoptose	4
1.3.3	Bedeutung und Ursachen der Apoptose von AT2-Zellen	5
1.4	Zielsetzung der Studie	
2	Material und Methoden	7
2.1	Tiermodell: Druckwellengenerator	7
2.2	Extrahierung von Probenmaterial	7
2.2.1	Induktion des Thoraxtraumas	7
2.2.2	Gewinnung von bronchoalveolärer Lavage (BAL)	8
2.2.3	Fixierung und Paraffinierung des Lungengewebes	9
2.3	Immunhistochemie	10
2.3.1	Antizytokeratin- Antikörper MNF 116	10
2.3.2	Aktive Caspase 3, Caspase 8, Fas, Fas-Ligand, Bax und Bcl-2	11
2.3.3	Auswertung	12
2.4	Enzyme-linked immunosorbend assay (ELISA)	13
2.4.1	Löslicher Fas-Ligand ELISA	13
2.4.2	IL-1 β ELISA	14
2.5	Isolation von AT2-Zellen	14
2.5.1	Tierarbeit	14
2.5.2	Laborarbeit	15
2.6	Koinkubation von AT2-Zellen	16

2.6.1	Isolation von Alveolarmakrophagen	16
2.6.2	Koinkubation mit Kulturüberständen von Alveolarmakrophagen	17
2.6.3	Koinkubation mit löslichem Fas-Ligand	17
2.7	Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von Apoptose	18
2.7.1	Annexin V	18
2.7.2	Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)	18
2.7.3	Mikroskopische Beurteilung	19
2.8	Statistik	19
3	Ergebnisse	20
3.1	Immunhistochemie	20
3.2	ELISA	24
3.2.1	IL-1 β ELISA	24
3.2.2	Löslicher Fas-Ligand ELISA	24
3.3	Koinkubation mit rekombinantem löslichen Fas-Ligand	25
3.4	Alveolarmakrophagenzellzahl	26
3.5	Koinkubation mit Kulturüberständen von Alveolarmakrophagen	27
4	Diskussion	30
4.1	Führt ein stumpfes Thoraxtrauma zur Induktion von Apoptose in AT2-Zellen?	30
4.2	Die Bedeutung der beschriebenen Signalwege der Apoptose in Bezug auf das stumpfe Thoraxtrauma	30
4.3	Der Zusammenhang zwischen den erhöhten IL-1 β und Fas-Ligand Konzentrationen in der BAL und der Apoptose in AT2-Zellen	32
4.4	Auswirkungen des löslichen Fas-Liganden auf die kultivierten AT2-Zellen	32
4.5	Einfluss der verschiedenen Zelltypen auf die Apoptoseinduktion	33
4.6	Steht die posttraumatische Vermehrung der Alveolarmakrophagen in Zusammenhang mit der Apoptose in AT2-Zellen?	34
5	Zusammenfassung	36
6	Literaturverzeichnis	38

Abkürzungsverzeichnis

ALI	Acute lung injury
ANOVA	Analysis of variance
APAAP	Alkaline Phosphatase-anti-alkaline Phosphatase
Apaf-1	apoptosis protease- activated factor-1
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AT1-Zelle	Aleolarepithelzelle Typ 1
AT2-Zelle	Aleolarepithelzelle Typ 2
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Bax	Bcl-2 associated x-Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAB	3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DISC	death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco`s phosphate-buffered saline
ELISA	Enzyme-linked immunosorbend assay
FADD	Fas associated protein with death domain
FCS	fetales Kälberserum
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff/Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	horseradish peroxidase/Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IL-1 β	Interleukin-1 β
min	Minute
mM	millimolar
NaCl	Natriumchlorid/Kochsalz
nm	nanometer

pg	pikogramm
pH	Potentia Hydrogenii
sec	Sekunde
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP-biotin nick end labelling
U	unit
x g	mal Erdbeschleunigung
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des Thoraxtraumas

1.1.1 Epidemiologie

Jährlich versterben in Deutschland etwa 20 000 Menschen an den Folgen eines Unfalls⁸¹, womit das Trauma die häufigste Todesursache in den ersten drei Lebensjahrzehnten darstellt. Dabei spielen traumatisch-hämorrhagischer Schock und Schädel-Hirn-Trauma bei dem frühen Tod von Unfallpatienten eine wichtige Rolle⁴. Davon abzugrenzen ist eine Spätletalität⁸³, die durch Komplikationen wie Sepsis und Multiorganversagen verursacht wird⁵⁹. Hierbei wird auch das Thoraxtrauma als bedeutender Wegbereiter des Multiorganversagens angesehen⁸⁹. Das stumpfe Thoraxtrauma, welches in der Bundesrepublik wesentlich häufiger beobachtet wird als penetrierende Verletzungen⁹⁰, ist somit sowohl isoliert, als auch im Rahmen eines Polytraumas eine hochrelevante Schlüsselverletzung. Klinischen Studien zufolge findet sich bei etwa 50-60% der polytraumatisierten Patienten ein begleitendes Thoraxtrauma^{22,32,90}. Damit stellt es laut einer Erhebung in den Jahren 1993 bis 1997 in der Bundesrepublik mit 45%, vor den Extremitätenverletzungen mit 42%, die häufigste relevante Verletzung im Rahmen eines Polytraumas dar⁴. Die Bedeutung des stumpfen Thoraxtraumas verdeutlicht, dass es für etwa 20% der posttraumatischen Todesfälle verantwortlich ist, wobei zwei Drittel dieser Patienten ihre Verletzungen bei Verkehrsunfällen erlitten³². Verkehrsunfälle bilden somit gefolgt von Stürzen aus großer Höhe den häufigsten Unfallmechanismus für ein stumpfes Thoraxtrauma⁹⁰. Aus dem Unfallmechanismus ergibt sich, dass das Thoraxtrauma selbst zu etwa 80% der Fälle in Kombination mit thorakalen und extrathorakalen Begleitverletzungen auftritt^{70,80}.

1.1.2 Prognose

Während ein isoliertes Thoraxtrauma mit 0,5% eine relativ geringe Letalität aufweist²⁸, finden sich beim polytraumatisierten Patienten mit begleitender Lungenkontusion deutlich höhere Werte. Die Sterblichkeitsrate bei Patienten unter 60 Jahren liegt bei 15-20% und steigt bei über 60-jährigen auf bis zu 40% an^{82,90}. Nach Gaillard²² kommt es bei mehrfachverletzten Patienten zu einem Anstieg der Letalität von 27% auf 56%, wenn eine Lungenkontusion Teil des Verletzungsmusters ist.

Die Ursachen, warum ein begleitendes Thoraxtrauma mit einem derartigen Anstieg in der Letalitätsrate behaftet ist, sind bisher weitgehend ungeklärt. Einerseits ist die Prognoseverschlechterung mit einem gehäuftem Auftreten von posttraumatischer respiratorischer Insuffizienz, Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) und Pneumonie vergesellschaftet. Andererseits findet sich eine erhöhte Inzidenz an extrapulmonalen Organfunktionsstörungen, welche ebenso zur Ausbildung einer Multiorgandysfunktion mit septischen Komplikationen beitragen können ^{66,80,89}. Zusammenfassend nimmt das Thoraxtrauma sowohl isoliert, aber vor allem im Rahmen einer Mehrfachverletzung eine herausragende Rolle hinsichtlich Morbidität und Mortalität ein.

1.2 Pathologische Grundlagen des Thoraxtraumas

1.2.1 Histologische Auffälligkeiten

Unter der bei einem stumpfen Thoraxtrauma auftretenden Lungenkontusion versteht man eine strukturelle und funktionelle Schädigung der Lunge als Folge einer nicht-penetrierenden Kompressions-Dekompressionsverletzung des Thorax ^{33,90}. Die daraus resultierende Schädigung der Alveolarmembranen und der vaskulären Strukturen führt sehr rasch zu interstitiellen und intraalveolären Blutungen. Im weiteren Verlauf kommt es aufgrund von Permeabilitätsstörungen der Lungenstrombahn zu einem interstitiellen Ödem ^{63,65,77}. Ursächlich hierfür scheinen durch Endothelzellschädigung hervorgerufene kapilläre Lecks zu sein ⁷⁶. Des Weiteren finden sich Lungenabschnitte mit verbreiterten Alveolarsepten und Atelektasen ^{13,27}, sowie perivaskulären Ödemen, eine Schwellung des Endothels ⁷⁶ und eine Sequestrierung von neutrophilen Granulozyten ^{67,88}.

1.2.2 Pathophysiologie der Lungenkontusion

Als Folge der pathologischen Veränderungen, insbesondere des Ödems und der Blutung und dem damit einhergehenden Verschluss der terminalen Luftwege, kollabieren die peripheren Alveolen ^{63,76,77,89}. Dies führt zur Abnahme der funktionellen Residualkapazität, da die betroffenen Alveolen für den Gasaustausch nicht mehr zur Verfügung stehen. Bei gleichzeitiger Reduktion der Compliance führt diese Ventilations-Perfusionsstörung zu einer Zunahme des Shuntvolumens, woraus sich eine massive Verschlechterung der respiratorischen Funktion mit posttraumatischer Hypoxämie ergibt

^{63,76,77,89}. Daraus erklärt sich die eingeschränkte Funktion der Lunge hinsichtlich Respiration und Metabolismus nach der Kontusion.

1.2.3 Inflammatorische Veränderungen

Aufgrund der in Kapitel 1.2.1 beschriebenen Permeabilitätsstörung der Lungenstrombahn kommt es schon kurze Zeit nach der pulmonalen Kontusion zu einer Sequestration von aktivierten neutrophilen Granulozyten, die durch zunehmende Degranulation und Freisetzung von gewebetoxischen Mediatoren eine lokale entzündliche Reaktion hervorrufen ^{27,63,67,88}. Diese führt zur lokalen Aktivierung des humoralen Gerinnungssystems sowie zu einer Inaktivierung des Surfactants ⁶⁴. Die beschriebenen Veränderungen lassen sich nicht nur im direkt kontusionierten Bereich der Lunge nachweisen, sondern finden sich über das gesamte Lungenparenchym verteilt ¹³. In der Lunge selbst kommt es außerdem zu einer Vermehrung sowie Aktivierung von Alveolarmakrophagen, welchen eine wichtige Rolle in der Infektabwehr sowie in der Beseitigung von apoptotischen und nekrotischen Zellen zukommt ^{43,50}. Als weiteres Indiz für die lokale Entzündungsreaktion konnte in der bronchoalveolären Lavage ein signifikanter Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen sowie chemotaktischer Mediatoren nachgewiesen werden ⁶⁷. Außerdem wurde gezeigt, dass durch die Schädigung der Lunge auch eine systemische entzündliche Reaktion verursacht wird. So kommt es neben einem Anstieg inflammatorischer Mediatoren im Plasma zu einer Funktionsänderung verschiedener, entfernt vom Ort der Schädigung lokalisierter Zellpopulationen wie Kupffer-Zellen, Milz- und Peritonealmakrophagen sowie Splenozyten ^{39,41,67}. Neben der lokalen Entzündungsreaktion scheinen die durch die zirkulierenden Entzündungsmediatoren vermittelten systemischen Einflüsse des Traumas für die Entwicklung einer generalisierten inflammatorischen Reaktion eine wichtige Rolle zu spielen ^{40,67}. Letztendlich sind die Mechanismen, die zum respiratorischen Versagen führen, nicht hinreichend geklärt. Daher sind unter experimentellen Bedingungen weiterführende Untersuchungen hinsichtlich dieser Fragestellung notwendig.

1.3 Apoptose von Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen)

Aus den unter 1.2.3 erwähnten inflammatorischen Auswirkungen des stumpfen Thoraxtraumas ergab sich die Hypothese, dass die Apoptose von AT2-Zellen in der Pathogenese der posttraumatischen respiratorischen Komplikationen eine Rolle spielt.

1.3.1 Alveolarepithel

Das Alveolarepithel besteht vorwiegend aus 2 Zelltypen, die sich hinsichtlich Funktion und Morphologie unterscheiden. Bei den AT1-Zellen handelt es sich um große, flach ausgezogene Zellen, die einen Anteil von 8-10 % der Lungenzellen bilden, jedoch etwa 95% der gasaustauschenden Fläche ausmachen^{3,12,14,19,93}. Die AT2-Zellen hingegen sind kuboidale, vorwiegend in den Alveolarecken lokalisierte Zellen mit zahlreichen zytoplasmatischen Organellen^{19,84,93}. Sie stellen ca. 15 % aller Lungenzellen und bilden ca. 5 % der gasaustauschenden Fläche^{12,14}. Zu ihren vielfältigen Funktionen zählen die Synthese von Surfactant^{3,69,75,84} und die Beteiligung an der Regeneration des Alveolarepithels durch Differenzierung in AT1-Zellen^{1,18,91}. Des Weiteren sind die AT2-Zellen an zahlreichen Abwehrvorgängen wie Phagozytose sowie der Produktion und Freisetzung von Zytokinen beteiligt^{71,100}. Neben den Alveolarepithelzellen finden sich in der Lunge Endothelzellen, interstitielle Zellen und Makrophagen, die die verbleibenden 75 % der in der Lunge befindlichen Zellen ausmachen¹².

1.3.2 Allgemeiner Ablauf der Apoptose

Programmierter Zelltod oder Apoptose bezeichnet einen exakt regulierten Einzelzelltod, bei dem die Gewebsarchitektur erhalten bleibt^{17,72,94} und Entzündungsvorgänge in keinem oder nur minimalem Ausmaß vorkommen^{3,15,84}. Morphologisch lässt sich dieser Prozess durch Vakuolisierung des Zytoplasmas, Verlust von Zell-Zell-Kontakten, Kondensation von Kernchromatin und Zytoplasma, sowie durch Fragmentation von Desoxyribonukleinsäure (DNA) charakterisieren^{8,10,11,46,52,101-103}. Als biochemische Veränderung findet sich eine Externalisierung von Phosphatidylserin auf die Membranaußenseite, welches als Erkennungssignal für phagozytierende Zellen dient^{11,57,84}. Der Vorgang der Apoptose kann in eine Initiations- und eine Effektorphase unterteilt werden, wobei die Initiationsphase durch extrinsische und intrinsische Stimuli initiiert werden kann⁷³.

Der extrinsische Weg wird eingeleitet durch die Ligandenbindung an einen Zellmembranoberflächenrezeptor der Tumornekrosefaktor (TNF) -Rezeptorfamilie (z. B. Fas). Diese so genannten Todesrezeptoren besitzen in ihrem zytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne. Zugehörige Liganden sind u. a. der Fas-Ligand und andere Zytokine, die beispielsweise von T-Lymphozyten sezerniert werden^{5,46,52,60}. Eine lösliche Form des Fas-Ligand entsteht bei der Abspaltung des membrangebundenen Fas-Ligand durch Metalloproteinasen^{54,58,86} und induziert ebenso Apoptose in empfänglichen Zellen⁸⁷.

Durch eine Trimerisierung des Rezeptors bilden die Todesdomänen eine Struktur, an die nun Adaptermoleküle mit eigener Todesdomäne durch homotypische Interaktionen binden können. In einem ersten Schritt bindet das „Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne“ (FADD, Fas associated protein with death domain) an den Fas-Rezeptor^{6,46}. Das FADD besitzt eine weitere Domäne über die die Procaspase 8 an den Komplex, der als „Tod-induzierender Signalkomplex“ (DISC, death inducing signaling complex) bezeichnet wird, bindet^{15,46,52,73,74}. Durch die mittels Bindung an den Signalkomplex entstehende hohe lokale Konzentration von Procaspase 8 kann sich diese nun autokatalytisch aktivieren und die sogenannte Caspase-Kaskade auslösen.

Beim intrinsischen Signalweg kommt es zur Freisetzung von Zytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma^{7,46,51}. Dies kann ausgelöst werden durch Tumorsuppressoren wie beispielsweise p53, einem Transkriptionsfaktor, der durch die Schädigung von DNA aktiviert wird. Durch die Bindung von Zytochrom C an den apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1, apoptosis protease-activated factor-1) wird eine Konformationsänderung des Proteins verursacht, so dass die Procaspase 9 an den Apaf-1 binden kann. Die Bildung dieses Heterodimers ist eine Voraussetzung für die autolytische Aktivierung der Caspase 9^{47,103}. Dieser Komplex wird als Apoptosom bezeichnet und stellt die aktive Form der Caspase 9 dar, die analog zu Caspase 8 die Caspase-Kaskade initiieren kann^{47,103}.

Reguliert wird dieser Signalweg u. a. mittels „B-Zell Lymphom-2 (Bcl-2, B-cell lymphoma-2) assoziiertem x-Protein“ (Bax, Bcl-2 associated x-protein), welches in höherer Konzentration als Bax-Bax-Homodimer die Freisetzung von Zytochrom C aus dem Mitochondrium bewirkt⁹⁹. In niedrigerer Konzentration bildet es zusammen mit Bcl-2 Heterodimere, wodurch Bax inaktiviert und die Apoptose gehemmt wird^{25,38,46,84,85,102,103}.

Ausgehend von der aktiven Caspase 8 bzw. Caspase 9 kommt es in der Effektorphase zur Aktivierung der Caspasen 3^{52,103}, 6 und 7^{46,73}, welche letztendlich für den apoptotischen Tod der Zelle infolge von DNA-Fragmentation und Spaltung von Struktur- und regulatorischen Proteinen verantwortlich sind^{46,52,84}.

1.3.3 Bedeutung und Ursachen der AT2-Zell-Apoptose

Im gesunden Lungenepithel spielt die Apoptose insbesondere in der fetalen Entwicklungsperiode und der normalen Gewebshomöostase eine entscheidende Rolle^{20,49}. Des Weiteren soll die Apoptose der AT2-Zellen mit der Regeneration des Epithels im Zusammenhang stehen, da die Gewebsarchitektur erhalten bleibt und

Entzündungsvorgänge minimiert werden ^{20,83,84}. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass AT2-Zell-Apoptose nach Ischämie, Lungenverletzung und während der Erholungsphase nach einer akuten Lungenverletzung im Menschen induziert wird ^{3,62,92}. Die Apoptose von AT2-Zellen spielt vermutlich jedoch auch bei pathologischen Vorgängen in der Lunge eine wichtige Rolle. Studie zufolge leistet sie somit einen bedeutenden Beitrag zur Pathogenese von acute lung injury (ALI, acute lung injury) und ARDS ^{31,53,56,58}, bei deren Entwicklung eine Reduktion von AT2-Zellen beobachtet wurde ⁸⁴. Dabei kommen hypothetisch sowohl die Alveolarmakrophagen über direkten Zell-Zell-Kontakt oder mittels Freisetzung löslicher Mediatoren, als auch die eingewanderten neutrophilen Granulozyten mittels oxidativem Stress als potentielle Auslöser für den Vorgang der Apoptose in Frage ^{56,58,67,88}. Ebenso wird einigen inflammatorischen Mediatoren wie TNF- α und Interleukin-1 β (IL-1 β) die Eigenschaft zugeschrieben, Apoptose in verschiedenen Zelltypen zu induzieren ^{9,16,45}. In dieser Hinsicht könnten Alveolarmakrophagen als Quelle dieser Mediatoren in Betracht gezogen werden ⁸⁸, womit sie zur Auslösung der Apoptose im Lungengewebe beitragen würden. Als weitere wichtige Ursache für die Induktion von Apoptose in AT2-Zellen wird oxidativer Stress angesehen ⁴⁸.

1.4 Zielsetzung der Studie

Die vorangegangenen Zusammenhänge führten zu der Hypothese, dass die in der Literatur beschriebene Apoptoseinduktion in AT2-Zellen bei ALI bzw. ARDS auch in der Pathogenese von respiratorischen Komplikationen nach einem stumpfen Thoraxtrauma eine Rolle spielt. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte in einem Rattenmodell eines stumpfen Thoraxtraumas die Apoptoserate von AT2-Zellen und Veränderungen von apoptoseinduzierenden Faktoren untersucht werden. Des Weiteren sollte die Rolle der Alveolarmakrophagen in der Apoptoseinduktion untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell: Druckwellengenerator

Das Thoraxtrauma wurde entsprechend der von Jaffin et al.³⁴ beschriebenen Methode kontaktlos durch eine Druckwelle ausgelöst, welche von einem Druckwellengenerator erzeugt wurde. Der Druckwellengenerator (siehe Abb. 1: eigene Herstellung: Wissenschaftliche Werkstatt Feinwerktechnik, Universität Ulm, Oberer Eselsberg, Ulm) setzte sich aus einem oberen und einem unteren Zylinder zusammen, die durch eine Mylarfolie (Du Pont GmbH, Bad Homburg) voneinander getrennt waren. Der untere offene Zylinder wurde mit einem Abstand von 2 cm über dem Brustkorb der Versuchstiere zentriert. Der obere Zylinder wurde über ein elektronisch auslösbares Hochgeschwindigkeitsventil (Hee-D-24, Festo, Esslingen) und einen Druckminderer (Flaschendruckminderer Zinser, Ebersbach) an eine Gasflasche mit Druckluft für Atemzwecke (MTI, Eichingen) angeschlossen, wobei der Druckminderer auf 13 bar eingestellt war. Durch Öffnen des Hochgeschwindigkeitsventils über den elektronischen Auslöser stieg der Druck im Oberteil des Druckwellengenerators an, bis die Berstspannung der Mylarfolie überschritten wurde. Dies bewirkte ein schlagartiges Zerreißen der Folie in Richtung Unterteil, was zur Entstehung der Druckwelle führte, die nun für das Thoraxtrauma des Versuchstieres verantwortlich war.



Abb. 1: Druckwellengenerator mit Druckerzeugungssystem und Druckmesssonde. Oberer und unterer Zylinder sind durch eine Mylarfolie voneinander getrennt, welche durch die druckbedingte Überschreitung der Berstspannung zerreißt. Somit konnte in Zentrierung über dem Thorax des Versuchstieres eine reproduzierbare Druckwelle erzeugt werden.

2.2 Extrahierung von Probenmaterial

2.2.1 Induktion des Thoraxtraumas

Als Versuchstiere wurden gesunde männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 250-275 g verwendet. Die Tiere wurden in den Ställen der Bereichstierhaltung Haus IV, Untergeschoss Safranberg (Ulm) des

Tierforschungszentrums der Universität Ulm bei einer Raumtemperatur von 21°C gehalten. Dabei hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter, bei welchem es sich um eine standardisierten Versuchstiernahrung (Altromin 1314 Forti, Altromin, Lage-Lippe) handelte. Die Hell-Dunkel-Phasen wurden in einen 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus eingeteilt. Sämtliche Tierversuche wurden ausschließlich in den Räumen der Bereichstierhaltung Safranberg durchgeführt. Die Versuchstiere wurden mittels einer Spülmaske in einer Sevofluran-Atmosphäre (Sevorane, Abbott GmbH, Wiesbaden) narkotisiert. Dazu wurden die Tiere zunächst in einer Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Kammer sediert und anschließend mit dem Kopf in der Spülmaske platziert, welche von einem Gemisch aus medizinischem Sauerstoff (Westfalen AG, Münster) und Sevofluran durchströmt wurde. Der Sauerstoff wurde über ein Rotameter (Drägerwerk AG, Lübeck) mit einem Fluss von 0,8 l pro Minute (min) zugeführt. Die Sevofluranbeimischung erfolgte über einen Vapor (Drägerwerk AG). Der Anteil des Narkosegases lag bei 3% und wurde zur Anpassung der Narkosetiefe des Tieres über den Vapor in diesem Bereich variiert. Wesentliche Vorteile der Sevoflurannarkose gegenüber intraperitoneal verabreichten Anästhetika liegen in der schnellen Narkoseinduktion und der guten Steuerbarkeit der Narkosetiefe. Die narkotisierten Tiere wurden mittels Klebestreifen mit abgespreizten Extremitäten in Rückenlage auf einer Plexiglasplatte fixiert, wobei zur Aufrechterhaltung der Narkose die Schnauze der Versuchstiere stets in der Spülmaske verblieb. Somit konnten die Ratten wie oben beschrieben unter dem Druckwellengenerator platziert werden. Anschließend wurde bei der Hälfte der Versuchstiere mit einem Abstand von 2 cm zwischen Thorax und unterem Zylinderrand das Thoraxtrauma ausgelöst. Bei den restlichen Tieren wurde ein Kontrolleingriff durchgeführt, bei dem sie mit Ausnahme des Thoraxtraumas genau derselben Prozedur unterzogen wurden. Bis zu den Zeitpunkten 30 min, 6 Stunden (h), 12 h, 24 h, 48 h und 7 Tage (d) nach dem Thoraxtrauma bzw. dem Kontrolleingriff, an denen die Probengewinnung erfolgte, hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter. Direkt im Anschluss an das Trauma bzw. den Kontrolleingriff erhielten die Versuchstiere eine Analgesie mittels Buprenorphin (Temgesic, Essex Pharma BmbH, München) in einer Dosierung von 0,01 mg/kg Körpergewicht. Die Applikation der Schmerzmedikation wurde in 12-stündigen Abständen wiederholt.

2.2.2 Gewinnung von bronchoalveolärer Lavage (BAL)

Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden die Versuchstiere zunächst in einer CO₂-Atmosphäre sediert, um sie anschließend mit circa 0,4 ml/kg Körpergewicht eines

intraperitoneal verabreichten 1:1 Gemisches aus Xylazin (Xylazinhydrochlorid 2% Alvetra, Neumünster) und Ketamin (Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml, Pharmacia & Upjohn, Erlangen) tief zu anästhesieren. Nachdem die Tiere auf dem Rücken lagernd befestigt wurden, wurde das Abdomen eröffnet und die Tiere mittels Punktion der Aorta abdominalis entblutet. Im Anschluss daran wurden das Zwerchfell und das Sternum bis zur Trachea durchtrennt. Für die nun folgende Fixierung des Lungengewebes wurde die Trachea kanüliert, wobei als Katheter der abgeschnittene Schlauch eines Butterflys (21 G, Ecoflo, Dispomed Witt, Gelnhausen) diente. Nach Abklemmen des rechten Hauptbronchus wurde die Lunge über den Katheter mit 3 ml Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) 3-mal gespült, wobei das DPBS zwischen den Zyklen nicht gewechselt wurde. Anschließend wurde die so gewonnene BAL in ein 15 ml Röhrchen (Becton Dickinson & Company, Falcon, Franklin Lakes, USA), welches bereits 5 Mikroliter (μl) eines Gemischs aus Proteinaseinhibitoren enthielt überführt. Dieses Gemisch setzte sich folgendermaßen zusammen: 12 μl Leupeptin (Leupeptin hydrochlorid, 1 mg/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim), 10 μl Trypsininhibitor (Trypsin inhibitor, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich), 5 μl Aprotinin (Aprotinin 1 mg/ml, Sigma-Aldrich) und 2 μl Pepstatin (Pepstatin A, 1 mg/ml, Sigma-Aldrich). Die Proben wurden nun für 15 min bei 380 x Erdbeschleunigung (x g) und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Fixierung und Paraffinierung des Lungengewebes

Nach Gewinnung der BAL wurde die Klemme am rechten Hauptbronchus entfernt und beide Lungen mit 10%-iger Formalinlösung aufgefüllt. Im Anschluss an die Entnahme der Lunge wurde diese für 48 h in 10%-iger Formalinlösung eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet. Dazu wurde das Lungengewebe zunächst in Plastikeinbettkassetten überführt und für 5 h unter fließendes Wasser gegeben, um das Formalin aus dem Gewebe zu waschen. Im Anschluss daran wurden die Kassetten im Einbettautomat (Leica Asp200, Leica Microsystems, Wetzlar) mittels einer, in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Paraffin übergossen. Die Alkoholreihe bestand aus 70%-igem, 80%-igem, 90%-igem und 100%-igem Ethanol, Methylbenzoat, Toluol, Xylol und nochmals 100%-igem Ethanol. 24 h später wurde das Gewebe in einer Ausgießstation (Microm EC-350-1, Microm, Walldorf) zu Paraffinblöcken gegossen. Dazu wurde zunächst die Mulde der Metallgießform mit Paraffin gefüllt und das einzubettende Gewebe draufgegeben. Schließlich wurde die Metallgießform komplett mit Paraffin

aufgefüllt und zum Aushärten auf die -4°C kalte Platte gestellt. Das Lungengewebe wurde mit einem Mikrotom (Microm HM450, Microm) auf 1 Mikrometer (μm) Dicke geschnitten. Für die weiteren Versuche wurde dabei jeweils der Mittellappen der rechten Lunge herangezogen.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Antizytokeratin- Antikörper MNF 116

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zunächst in Xylol und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe (100%, 95%, 70%) überführt. Es folgten Waschschriffe in destilliertem Wasser und DPBS (Gibco BRL; Grand Island, USA). Da der MNF 116-Antikörper (monoclonal mouse anti-human cytokeratin clone MNF 116, DakoCytomation, Carpinteria, USA) gegen intrazelluläre Zytokeratinfilamente gerichtet ist, muss eine Permeabilisation der Zellen erfolgen. Dies wurde durch eine 15-minütige Inkubation der Schnitte mit einer Proteinase K-Lösung (Roche, Penzberg) in einer dunklen Kammer bei 37°C gewährleistet. Nach Waschen der Objektträger in destilliertem Wasser wurden unspezifische Fc-Fragmente 30 min durch Zugabe von 0,1% bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich) in TBS (Tris-Puffer: 0,05 mol/l Tris-Chlorwasserstoff (HCl, Sigma-Aldrich), 0,15 mol/l Natriumchlorid (NaCl, Sigma-Aldrich), pH 7,6) geblockt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C mit dem Erstantikörper (monoclonal mouse anti-human cytokeratin clone MNF 116, DakoCytomation) inkubiert, welcher 1:150 in TBS verdünnt wurde. Die Detektion des Antikörpers erfolgte mittels eines alkalischen Phosphatase anti-alkalische Phosphatase-Systems (APAAP) für primäre Mausantikörper (DakoCytomation). Im Anschluss an die Inkubationsphase des Erstantikörpers wurden die Objektträger in TBS gewaschen, um daraufhin 2 Tropfen des Zweitantikörpers (polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin (Ig)/goat F(ab')₂, DakoCytomation) zuzugeben. Der 30-minütigen Inkubationsphase folgte ein Waschschriff in TBS. Zur Entwicklung der Schnitte wurden die Präparate für 30 min bei Raumtemperatur mit APAAP (DakoCytomation) beschichtet, wobei anschließend wiederum mit TBS gewaschen wurde. Die anschließende Inkubation mit der APAAP-Substratlösung (DakoCytomation) wurde für 20 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach einem weiteren Waschvorgang in TBS wurden die Schnitte zur Kernfärbung für 10 Sekunden (sec) in Mayers Hämalaun (AppliChem, Darmstadt) überführt. Anschließend wurden die Objektträger 10-mal in 0,037 molares

Ammoniakwasser (Ammoniumhydroxid, Fluka, Buchs) getaucht und für 10 min zum Bläuen unter fließendes Leitungswasser gegeben. Zur Fixierung der Deckgläser (Menzel-Glaser, Braunschweig) wurde Faramount Aqueous Mounting Medium (DakoCytomation) verwendet.

2.3.2 Aktive Caspase 3, Caspase 8, Fas, Fas-Ligand, Bax und Bcl-2

Die Entparaffinierung der Präparate erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben. Um das von der Fixierung stammende Formalin, welches eine Maskierung der Antigene bewirkt, herauszulösen, wurde im Anschluss an die Entparaffinierung eine Mikrowellenbehandlung in 10 millimolarem (mM) Citratpuffer (Sigma-Aldrich) durchgeführt. Nach einem weiteren Waschschrift in DPBS wurden die Schnitte mit einer Quenchinglösung bestehend aus Methanol und 30%-igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) inkubiert, um eine Blockade der endogenen Peroxidase zu gewährleisten. Dem anschließenden Waschen in DPBS folgte die Inkubation der Schnitte mit dem Erstantikörper verdünnt in DPBS mit 1,5% Ziegen-Normalserum (DakoCytomation), wobei die jeweils benötigte Verdünnung in Vorversuchen ausgetestet wurde. Dabei erwiesen sich für den jeweiligen Erstantikörper folgende Konzentrationen als ideal:

1. aktive Caspase 3: 1:20 (rabbit anti-active caspase-3 polyclonal antibody, PharMingen, San Diego, USA)
2. Caspase 8: 1:75 (rabbit anti-caspase-8 polyclonal antibody, Dianova, Hamburg)
3. Fas: 1:25 (rabbit anti-fas polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
4. Fas-Ligand: 1:50 (rabbit anti-fas-L polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology)
5. Bax: 1:50 (rabbit anti-bax polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology)
6. Bcl-2: 1:100 (rabbit anti-bcl-2 polyclonal antibody, PharMingen)

Als Negativkontrolle diente Kaninchen-Normalserum (DakoCytomation), welches 1:5000 in DPBS mit 1,5%-igem Ziegen-Normalserum verdünnt wurde. Die Inkubation der Schnitte mit dem Erstantikörper bzw. der Negativkontrolle erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.

2-maligen Waschschritten mit DPBS folgend wurden die Schnitte mit dem Zweitantikörper (goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP), DakoCytomation) inkubiert. Dabei erwies sich bei allen Färbungen eine 1:100 Verdünnung in DPBS mit 1,5%-igem Ziegen-Normalserum als optimal. Mit diesem, mit Meerrettichperoxidase konjugierten Antikörper, wurde sowohl der eigentliche Schnitt, als auch die Negativkontrolle für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend wiederum in DPBS gewaschen. Zur Detektion der Antikörper wurde 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Sigma-Aldrich) verwendet, wobei die 15-minütige Inkubation der Schnitte in der DAB-Lösung auf einem Schüttler im Dunkeln durchgeführt wurde. Die Objektträger wurden in destilliertem Wasser gespült und abschließend die Zellkerne durch 10-sekündiges Eintauchen in Mayers Hämalaun (AppliChem) angefärbt. Nach einem 10-minütigen Bläuen unter fließendem Leitungswasser wurden die Deckgläser wiederum mit Faramount Aqueous Mounting Medium (DakoCytomation) fixiert.

2.3.3 Auswertung

Bei der MNF 116-Färbung wurden zur Bestimmung von Veränderungen der AT2-Zellzahl zwischen Kontroll- und Traumatisieren 20 Gesichtsfelder bei 630-facher Vergrößerung ausgezählt. Die MNF-positiven AT2-Zellen zeigten sich dabei als kuboidale, insbesondere in den Alveolarecken lokalisierte Zellen, während die flachen und ausgezogenen AT1-Zellen nicht mit MNF angefärbt wurden. Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen dem Proteinase K-Verdau der MNF 116-Färbung und der Citratbehandlung der anderen immunhistochemischen Färbungen gelang trotz wiederholter Etablierungsversuche eine Doppelfärbung mit MNF 116 und jeweils einem der unter 2.3.2 beschriebenen Antikörper nicht. Dies erschwerte die Auswertung der Färbungen von 2.3.2 insofern, dass positiv angefärbte Zellen nur nach morphologischen Kriterien als AT2-Zellen identifiziert werden konnten. Dabei wurde sowohl die Form als auch die Lokalisation der Zellen in die Beurteilung mit einbezogen. Bestimmt wurde die Anzahl an positiven AT2-Zellen gesehen auf eine Gesamtzahl von 200 gezählten AT2-Zellen pro Schnitt.

Des Weiteren wurden in der MNF 116-Färbung die Anzahl der in den Alveolen befindlichen Alveolarmakrophagen bestimmt. Hierbei wurden ebenso 20 Gesichtsfelder bei 630-facher Vergrößerung ausgewertet und der Mittelwert gebildet. Die Zellen wurden hier ebenso nach Lokalisation und morphologischen Kriterien, wie ovaler Zellkern, diffuses Kernchromatin sowie variable Anzahl an zytoplasmatischen Vakuolen beurteilt ²⁶.

2.4 ELISA

2.4.1 Löslicher Fas-Ligand ELISA

Als Technik zur Bestimmung von löslichem Fas-Ligand in der BAL wurde ein indirekter ELISA gewählt, bei dem der gegen das Antigen gerichtete Antikörper nicht direkt markiert ist, sondern erst mittels eines Zweitantikörpers detektiert werden muss.

Zur Vorbereitung wurden die Proben zunächst 1:200 mit Coating Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8,5) verdünnt und die Standardlösung hergestellt. Dazu wurde mit dem rekombinanten Fas-Ligand der Ratte (0,05 mg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA), welcher als Standardprotein verwendet wurde, eine Lösung der Konzentration 15000 pikogramm (pg)/ml hergestellt. Diese diente nun als Grundlage für die Verdünnungsreihe (2:1). Anschließend wurden jeweils 100 µl der Probe bzw. des Standards auf die Mikrotiterplatte (C96 Maxisorp Cert., NUNC, Wiesbaden) pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit von der Platte entfernt und pro Well 300 µl Blocking Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8,5 + 0,05% Tween 20 + 3% BSA) zum Blockieren unspezifischer Bindungen hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei 37°C wurde 4-mal mit jeweils 300 µl Wash Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8,5 + 0,05% Tween 20) gewaschen, 50 µl/Well des Erstantikörpers (Anti-rat Fas-Ligand/TNFSF6 Antibody, R&D Systems) hinzupipettiert und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem 4-maligem Waschen mit 300 µl Wash Buffer wurde für 1 h mit jeweils 50 µl des biotinylierten Zweitantikörpers (Biotin-SP-conjugated AffiniPure Anti Goat IgG, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum 4-mal mit 300 µl Wash Buffer gewaschen. Anschließend folgte eine 1-stündige Inkubationsphase mit 50 µl Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (Jackson ImmunoResearch). Einem weiteren Waschschrift folgend wurde in jedes Well 50 µl Tetramethylbenzidin (TMB) Reagenz (TMB Substrate Reagent Set, Pharmingen) pipettiert und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Um die Farbentwicklung zu stoppen wurde abschließend 50 µl/Well Stopplösung (2N Schwefelsäure, Sigma-Aldrich) zugefügt und die Absorption bei 450 Nanometer (nm, Referenzfilter 570 nm) am Microplate-Reader (Tecan sunrise, Crailsheim) photometrisch gemessen. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der aus den Standards berechneten Eichgeraden ermittelt.

2.4.2 IL-1 β ELISA

Zur Bestimmung von IL-1 β in der BAL der Ratte wurde ein Sandwich- ELISA- Kit (BioSource International, Camarillo, USA) mit einer Sensitivität von 31,2-2000 pg/ml gewählt. Dabei handelt es sich um eine direkte ELISA- Technik, bei der der Erstantikörper biotinyliert ist und somit kein Zweitantikörper benötigt wird. Die Testdurchführung richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers.

Zu Beginn wurden jeweils 100 μ l der Probe (1:1 verdünnt mit Standard Diluent Buffer) bzw. der Verdünnungen des Standards (2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml und 31,2 pg/ml, mit Standard Diluent Buffer verdünnt) auf die Mikrotiterplatte pipettiert, welche bereits mit einem für die Ratte spezifischen IL-1 β Antikörper beschichtet war. Nach einer 3-stündigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur wurden die Wells mit jeweils 400 μ l Wash Buffer 4-mal gewaschen. Anschließend wurden pro Well 100 μ l des biotinylierten IL-1 β Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur zugefügt. Nach erneutem Waschen wurden 100 μ l der Streptavidin-HRP Working Solution hinzupipettiert, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum gewaschen. Nach Zugabe von jeweils 100 μ l Stabilized Chromogen (Tetramethylbenzidine) beginnt sich die Flüssigkeit in den Wells blau zu färben. Um diese Farbreaktion zu stoppen werden nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln 100 μ l der Stop Solution hinzupipettiert und die Absorption bei 450 nm am Microplate-Reader (Tecan sunrise) photometrisch gemessen. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der aus den Standards berechneten Eichgeraden ermittelt.

2.5 Isolation von AT2-Zellen

2.5.1 Tierarbeit

Für die Isolation der AT2-Zellen wurden gesunde männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River) mit einem Gewicht von 250-275 g verwendet. Die Tierarbeit erfolgte bis zur Kanülierung der Trachea analog Punkt 2.2.2. In diesem Fall diente der Katheter jedoch zur Spülung des Alveolarraums, wobei die Lungen durch 8-maliges Spülen mit jeweils 10 ml frischen 4°C-kaltem DPBS (10 ml-Spritzen, Becton Dickinson & Company) von einem Großteil der in den Alveolen befindlichen Makrophagen befreit wurden. Der Effekt dieser Spülung wurde durch ein leichtes Massieren des Thorax ab der dritten Instillation

erheblich verbessert. Nachdem im Anschluss an die letzte Lavage eine 20 ml Spritze (Becton Dickinson & Company) gefüllt mit kaltem DPBS an das System angeschlossen wurde, erfolgte die vorsichtige Entnahme des Herz-Lungenpakets. Durch Instillation von 2-3 ml kaltem DPBS wurde die Lunge auf ihre Integrität überprüft und anschließend in einem Becherglas mit sterilem, 4°C-kaltem, 0,9%-igem NaCl ins Labor transportiert.

2.5.2 Laborarbeit

Die Isolation der AT2-Zellen wurde in enger Anlehnung an die von Dobbs et al.¹⁴ beschriebene Methode durchgeführt. Um die Zellen aus dem Epithelverband zu lösen wurde über den bei der Tierarbeit gelegten intratrachealen Katheter 40 ml DPBS mit 172 units (U) Pankreaselastase (Worthington Biochemical, Freehold, USA) über einen Zeitraum von 20 min in die Lunge infundiert. Dabei flottierte die Lunge in einem 37°C-warmen Wasserbad in DPBS. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden in sterilem Milieu unter der Sterilbank durchgeführt. Nachdem Herz und Hilus aseptisch entfernt wurden, wurde die Lunge in DNase I (1000 U; Sigma-Aldrich) überführt und mechanisch zerkleinert, wobei auch dieser Schritt dazu diente die Zellen aus ihrem Verband zu lösen. Durch die Zugabe von 5 ml Ultra-low IgG fetal calf serum (FCS, Life Technologies, Rockville, USA) wurde die Enzymaktivität gestoppt. Es folgte ein forciertes Mischen des Homogenates für 20 min auf einem Magnetrührer. Im Anschluss daran wurden die Zellen über Filter unterschiedlicher Maschengröße (500 nm, 200 nm, 100 nm, VWR, Wien, Österreich) gegeben und für 10 min bei 450 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco) resuspendiert und die Zellsuspension mit DMEM auf 40 ml aufgefüllt. Um restliche Alveolarmakrophagen zu entfernen, wurden jeweils 10 ml der Suspension auf 4 mit Ratten-IgG (30 µg/ml, Sigma-Aldrich) beschichteten bakteriologischen Petrischalen (100 x 15 mm, Becton Dickinson & Company) ausgebracht und für 1 h bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Während die Alveolarmakrophagen adhärirten, blieben die AT2-Zellen im Überstand und konnten somit abgenommen und zentrifugiert werden. Anschließend wurde das Pellet in DMEM⁺ + 10% FCS bestehend aus 500 ml DMEM, 10 ml nichtessentiellen Aminosäuren (Gibco), 10 ml Penicillin/ Streptomycin (Gibco), 10 ml L-Glutamin (Gibco) und 55 ml hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom KG, Berlin), resuspendiert und gezählt, wodurch eine Einstellung der Zellzahl auf 1 x 10⁶ Zellen pro ml Medium ermöglicht wurde. Nun wurden zur Kultivierung der Zellen 0,5 ml der Suspension pro Well auf gekammerte Objektträger (Lab-Tek II Chamber Slide w/Cover RS glass slide sterile, Nalge Nunc International,

Naperville, USA) bzw. 1 ml pro Well auf 24er-Well Zellkulturplatten (Becton Dickinson & Company) ausgebracht. Nach einer 48-stündigen Wachstumsphase bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre wurde das Medium abgenommen und nicht adhärenente Zellen mit raumtemperierten DMEM durch 8-maliges auf- und abpipettieren in jedem Quadranten heruntergewaschen. Als neues Medium wurde 0,5 ml bzw. 1 ml DMEM⁺ + 0,5% FCS, welches sich aus 500 ml DMEM, 10 ml nichtessentiellen Aminosäuren, 10 ml Penicillin/ Streptomycin, 10 ml L-Glutamin und 2,5 ml hitzeinaktiviertem FCS zusammensetzte, zugegeben. Weitere 18 h im Brutschrank vervollständigten die Konfluenz des Zellrasens, so dass die Zellen nun für die Kokulturen herangezogen werden konnten.

2.6 Koinkubation von AT2-Zellen

2.6.1 Isolation von Alveolarmakrophagen

Die Tierarbeit zur Gewinnung der Alveolarmakrophagen aus den Kontroll- und Traumatieren zu den Zeitpunkten 4, 24 und 48 h nach Eingriff, wurde bis zur Einführung des intratrachealen Katheters entsprechend Punkt 2.2.2 durchgeführt. Über den Katheter erfolgte nun die 5-malige Spülung der Bronchien und des Alveolarraumes mit jeweils 10 ml kaltem DPBS, um die Makrophagen zu gewinnen. Dabei wurde der Thorax des Versuchstiers ab dem dritten Durchgang vorsichtig massiert, da somit die Ausbeute an Alveolarmakrophagen gesteigert werden konnte. Die Flüssigkeit wurde anschließend bei 4°C und 400 x g für 10 min zentrifugiert. Alle darauf folgenden Arbeitsschritte wurden in sterilem Milieu unter der Sterilbank durchgeführt. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die im Zellgemisch befindlichen Erythrozyten durch Zugabe von 10 ml sterilem destillierten Wasser lysiert. Der Lysevorgang wurde anschließend durch die Zugabe von 2,7%-igem NaCl beendet. Nach Auffüllen des Gefäßes mit 30 ml DPBS wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen, um den Lysevorgang zu wiederholen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet nun in 1 ml DMEM resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Trypanblau (Sigma-Aldrich) angefärbt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurde mit DMEM eine Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Daraufhin wurde jeweils 1 ml der Suspension auf 24er-Well Zellkulturplatten (Becton Dickinson & Company) gegeben, um die Zellen für 45 min bei 37°C und 5%-iger CO₂-Atmosphäre adhärenieren zu lassen. Nicht adhärenente Zellen wurden nach diesem Inkubationsschritt durch vorsichtiges Waschen mit DMEM

entfernt, um den Zellrasen anschließend mit 1 ml DMEM⁺ + 0,5% FCS für 24 h bei 37°C und 5%-iger CO₂-Atmosphäre zu inkubieren. Sowohl durch die Lyse, als auch durch den Waschschrift konnte ein sehr hoher Reinheitsgrad der Alveolarmakrophagenkultur erzielt werden. Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurde der Überstand gewonnen und zentrifugiert. Die konditionierten Medien wurde bis zur Verwendung für die Koinkubation bei -80°C aufbewahrt.

2.6.2 Koinkubation mit Kulturüberständen von Alveolarmakrophagen

Für die Koinkubation wurden die zuvor auf den gekammerten Objektträgern kultivierten AT2-Zellen jeweils mit folgenden Ansätzen für 6 h bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre überschichtet:

- 250 µl des Alveolarmakrophagen-Überstandes eines Kontrolltieres ohne 0,5 mM H₂O₂-Lösung
- 250 µl des Alveolarmakrophagen-Überstandes eines Kontrolltieres mit 0,5 mM H₂O₂- Lösung
- 250 µl des Alveolarmakrophagen-Überstandes eines Traumatieres ohne 0,5 mM H₂O₂-Lösung
- 250 µl des Alveolarmakrophagen-Überstandes eines Traumatieres mit 0,5 mM H₂O₂- Lösung

Zusätzlich wurde als Kontrolle je ein Well nur mit DMEM⁺ + 0,5% FCS bzw. mit DMEM⁺ + 0,5% FCS + 0,5 mM H₂O₂ inkubiert. Nach der Inkubationsperiode wurden die Zellen fixiert, um anschließend die Apoptosenachweise durchführen zu können. Für die Annexin V und die Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP-biotin nick end labeling-Färbung (TUNEL) erfolgte die Fixierung durch Zugabe von 27 µl 4°C- kaltem 37%-igem Formalin zum Inkubationsmedium. Nach 1 h Wirkzeit im Kühlschrank wurde das formalinhaltige Medium abgenommen und die Zellen mit 500 µl DPBS überschichtet. So konnten die Zellen bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2.6.3 Koinkubation mit löslichem Fas-Ligand

Hierzu wurden die AT2-Zellen für einen Zeitraum von 18 h bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre mit 3 verschiedenen Konzentrationen an löslichem Fas-Ligand (soluble Fas-Ligand, Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA) überschichtet. Für die Herstellung der Konzentrationen 50 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml wurde als Medium DMEM⁺ + 5% FCS gewählt. Diesem wurde für die Kontrolle anstelle des löslichen Fas-

Ligand das identische Volumen an DPBS beigefügt. Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte wie unter Punkt 2.6.2 fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.7 Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von Apoptose

2.7.1 Annexin V

Zur Vorbereitung dieser Färbung, bei der externalisierte Phosphatidylserinmoleküle nachgewiesen werden können, wurden zunächst zwei verschiedene Pufferlösungen hergestellt. Zum einen der TNB-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,5% Albumin und 2 mM Calciumchlorid (CaCl₂, pH=7,5, Sigma-Aldrich) der zur Blockade unspezifischer Fc-Fragmente und zur Antikörperverdünnung verwendet wurde und zum anderen der TNT-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween, 2 mM CaCl₂, pH=7,5), der zur Herstellung der Bisbenzimidlösung und zum Waschen diente.

Die auf den gekammerten Objektträgern befindlichen Zellen wurden nun zunächst 2-mal mit DPBS und 2-mal mit TNT-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für 45 min mit 500 µl TNB/ Well TNB-Puffer inkubiert, wodurch unspezifische Fc-Fragmente blockiert wurden. Danach wurden die Kammern der LabTecs entfernt und pro Well jeweils 50 µl des Antikörpers (anti-human Annexin V (rekombinant) Biotin, Hölzel Diagnostika, Köln), welcher 1:50 mit TNB-Puffer verdünnt wurde, aufgetragen. Die Objektträger wurden so für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert, mittels welcher die Austrocknung der Schnitte verhindert wurde. Dem 5-maligem Waschen mit TNT-Puffer folgte die Inkubation der Zellen mit 50 µl/Well Streptavidin Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Karlsruhe) wiederum für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Dunkelkammer. Nach dem anschließenden Waschen mit TNT-Puffer wurden die Zellkerne durch ein 15-minütiges Einbringen der Objektträger in eine Bisbenzimidlösung (Sigma-Aldrich) angefärbt. Es folgte noch ein weiterer Waschschrift mit TNT-Puffer, bevor die Zellen nun mikroskopisch beurteilt werden konnten.

2.7.2 TUNEL

Zum Nachweis von bei Apoptose auftretenden DNA-Bruchstücken wurden die Zellen zunächst 2-mal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 500 µl kaltes 70%-iges Ethanol pipettiert und für 2 h im Kühlschrank inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit DPBS und mit der im Kit (APO-direct-Kit, Becton Dickinson & Company) enthaltenen Waschlösung wurden die Kammern der verwendeten Objektträger entfernt

und pro Well 50 μ l der Reaktionslösung aufgetragen. Diese setzte sich aus dem TdT Reaktionspuffer, dem TdT Enzym und dem Fitc dUTP des Kits und destilliertem Wasser zusammen und verblieb für 3 h bei 37°C in feuchtem Milieu auf den Zellen. Darauf folgten Waschschrirte mit DPBS und Rinse Puffer, der ebenfalls im Kit enthalten war. Zuletzt wurde pro Well 50 μ l der PI/RNAse-Lösung in einer 1:2 Verdünnung mit DPBS zupipettiert und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit DPBS und destilliertem Wasser konnten die Schnitte mikroskopiert werden.

2.7.3 Mikroskopische Beurteilung

Von einer Person, der die Gruppeneinteilung nicht bekannt war, wurden bei 200-facher Vergrößerung jeweils 3 Gesichtsfelder der gefärbten Schnitten photographiert (Axio Imager M1, Zeiss, Oberkochen). Ausgewertet wurden die Bilder mit der zugehörigen Software (Axio Vision 4.4, Zeiss). Dazu wurde zunächst mittels der Kernfärbung die Gesamtzellzahl bestimmt und anschließend nach Auszählung der positiv gefärbten Zellen der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen errechnet.

2.8 Statistik

Die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Färbungen, den ELISAs, den Koinkubationsversuchen sowie der Auswertung der Alveolarmakrophagenzellzahl wurden auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dazu kamen sowohl der t-test, als auch ANOVA-on-ranks (Analysis of variance, Varianzanalyse) zur Anwendung.

Bei $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant erachtet. Die Ergebnisse wurden in den Diagrammen als Mittelwerte \pm Standardfehler als Fehlerbalken angegeben.

Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm SigmaStat Version 2.0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Deutschland) verwendet. Alle Diagramme wurden mit dem Computerprogramm SigmaPlot 2001 (SPSS Science Software GmbH) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie

Die zur Ermittlung von Veränderungen der AT2-Zellzahl durchgeführte MNF 116-Färbung von Paraffinschnitten des rechten Mittellappens zeigte in der Kontrollgruppe konstante Zellzahlen, während in der Traumagruppe eine signifikante Erniedrigung der AT2-Zellzahl zum Zeitpunkt 48 h nach dem Thoraxtrauma gegenüber 7 d nach dem Thoraxtrauma beobachtet wurde (Abb. 2 A+B).

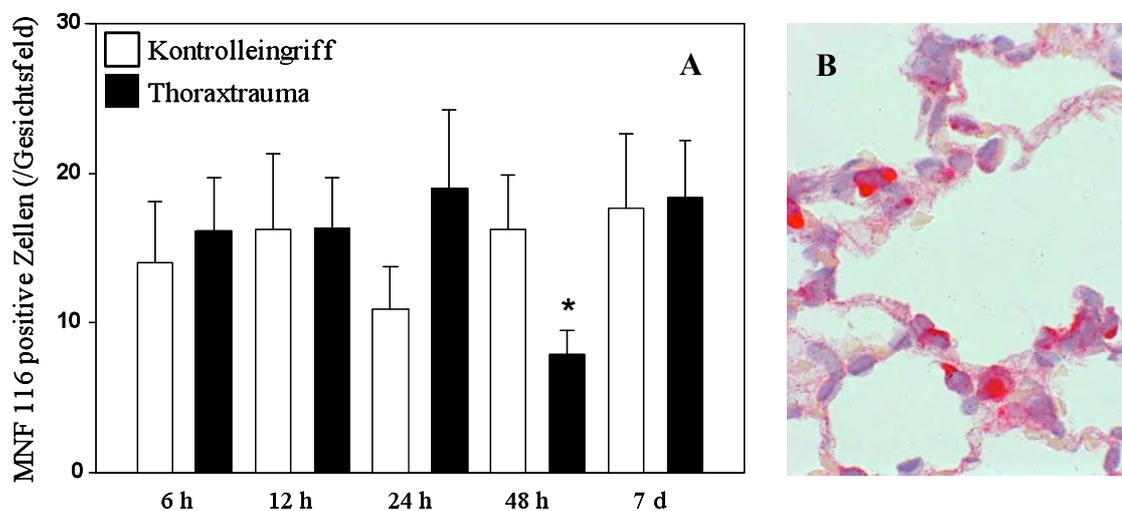


Abb. 2 A+B: Mittlere Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) im rechten Mittellappen von männlichen Sprague Dawley Ratten 6, 12, 24, 48 Stunden (h) und 7 Tage (d) nach Kontrolleingriff oder stumpfen Thoraxtrauma (n=5/Gruppe). Die Lungen wurden mit dem Antizytokeratinantikörper MNF 116 (DakoCytomation, Carpinteria, USA) immunhistochemisch gefärbt. In 20 Gesichtsfeldern ($630 \times$ Vergrößerung) wurde die Anzahl MNF 116 positiver Zellen unter Berücksichtigung der Morphologie und der typischen Lokalisation ausgezählt, um die Gesamtzahl der AT2-Zellen zu bestimmen. * $p < 0,05$ vs. 7 d Thoraxtrauma, t-test, Mittelwert \pm Standardfehler.

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die Apoptose als auslösender Faktor für die reduzierte Zellzahl verantwortlich sein könnte, wurden die Gewebeschnitte auf verschiedene Apoptosemerkmale getestet. Dabei wurden sowohl Faktoren der extrinsischen als auch der intrinsischen Signalkaskade untersucht.

Hierbei fand sich 48 h nach dem Trauma ein signifikanter Anstieg an aktive Caspase 3 positiven AT2-Zellen im Vergleich zur Traumagruppe zum Zeitpunkt 7 d nach dem Eingriff (Abb. 3 A+B).

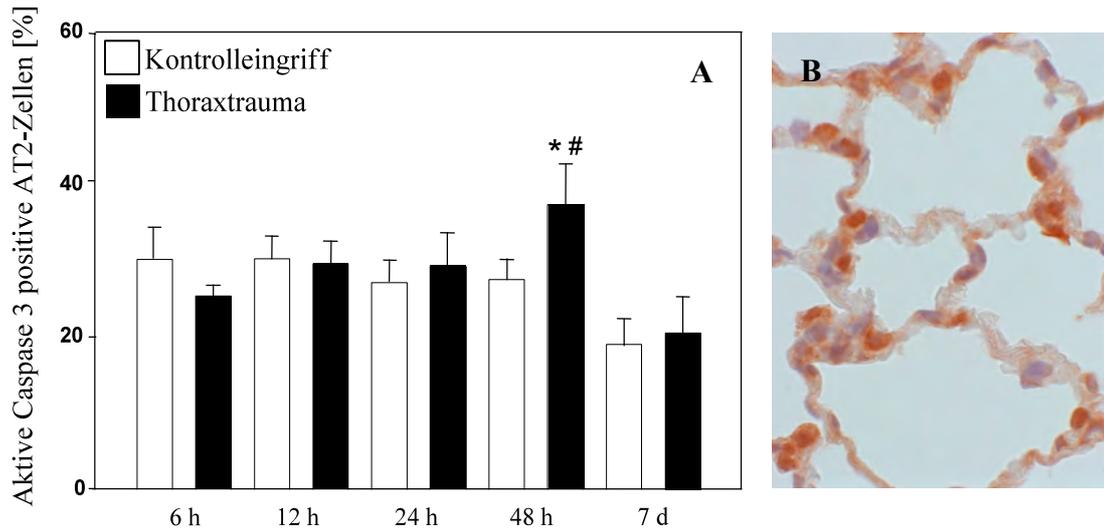


Abb. 3A+B: Mittlere Prozentzahl von Caspase 3 positiven Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2 Zellen) im rechten Mittellappen von männlichen Sprague Dawley Ratten 6, 12, 24, 48 Stunden (h und 7 Tage (d) nach Kontrolleingriff oder stumpfen Thoraxtrauma (n=4-5/Gruppe). Die Lunge wurden mit dem aktiven Caspase 3-Antikörper (PharMingen, San Diego, USA) gefärbt. Bei 630 facher Vergrößerung wurden 200 AT2-Zellen nach Morphologie und Lage charakterisiert und der Prozentsatz an aktiven Caspase 3 positiven AT2-Zellen bestimmt. *p<0,05 vs. zugehörigen Kontrollzeitpunkt, #p<0,05 vs. 7 d Thoraxtrauma t-test, Mittelwert ± Standardfehler.

Des Weiteren ergab die Auswertung der auf Fas gefärbten Paraffinschnitten einen signifikanten Anstieg an positiven AT2-Zellen bei 12, 24, 48 h und bei 7 d nach Thoraxtrauma gegenüber dem jeweiligen Kontrollzeitpunkt (Abb. 4).

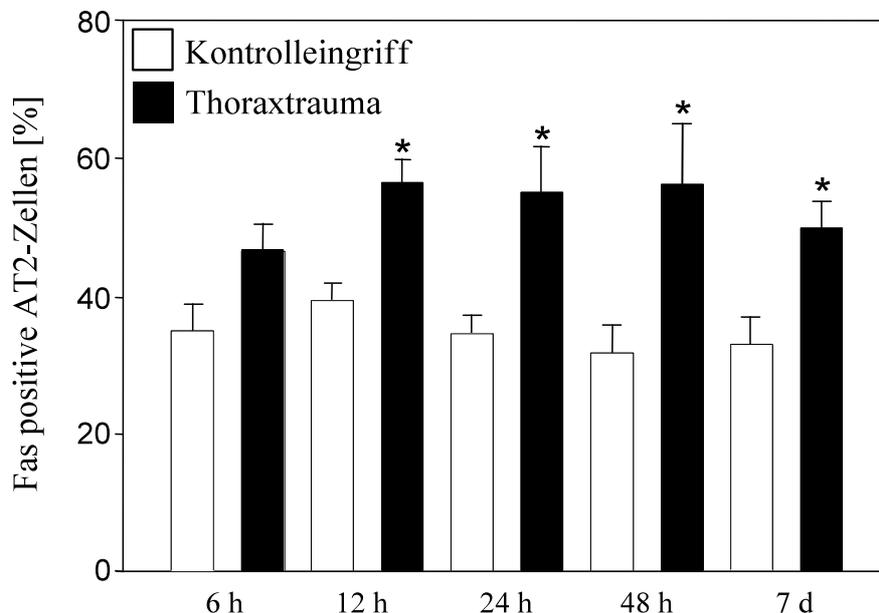


Abb. 4: Mittlere Prozentzahl von Fas positiven Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) im rechten Mittellappen von männlichen Sprague Dawley Ratten 6, 12, 24, 48 Stunden (h) und 7 Tage (d) nach Kontrolleingriff oder stumpfem Thoraxtrauma (n=3-5/Gruppe). Die Lungen wurden mit dem Fas-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) gefärbt. Bei 630-facher Vergrößerung wurden 200 AT2-Zellen nach Morphologie und Lage charakterisiert und der Prozentsatz an Fas positiven AT2-Zellen bestimmt. *p<0,05 vs. zugehörigem Kontrollzeitpunkt, t-test, Mittelwert ± Standardfehler.

Bei der Fas-Ligand Färbung der Paraffinschnitte des rechten Mittellappens der Lunge waren die positiven AT2-Zellen zu den Zeitpunkten 24 und 48 h, sowie bei 7 d nach dem Thoraxtrauma im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen ebenso signifikant erhöht (Abb. 5).

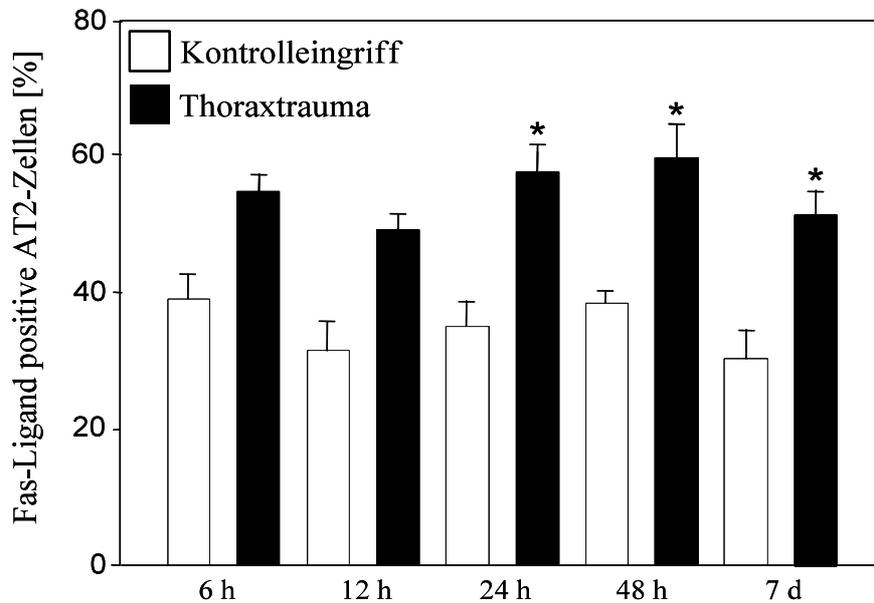


Abb. 5: Mittlere Prozentzahl von Fas-Ligand positiven Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) im rechten Mittellappen von männlichen Sprague Dawley Ratten 6, 12, 24, 48 Stunden (h) und 7 Tage (d) nach Kontrolleingriff oder stumpfem Thoraxtrauma (n=4-5/Gruppe). Die Lungen wurden mit dem Fas-Ligand-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) gefärbt. Bei 630-facher Vergrößerung wurden 200 AT2-Zellen nach Morphologie und Lage charakterisiert und der Prozentsatz an Fas-Ligand positiven AT2-Zellen bestimmt. *p<0,05 vs. zugehörigem Kontrollzeitpunkt, t-test, Mittelwert ± Standardfehler.

Auch Caspase 8 positive AT2-Zellen waren bei 6, 24, 48 h und bei 7 d nach dem Thoraxtrauma im Vergleich zu den zugehörigen Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 6).

Im Gegensatz dazu konnte bei den Bax und Bcl-2 gefärbten Gewebeschnitten zu keinem der Zeitpunkte eine Veränderung in der AT2-Zellzahl zwischen der Kontroll- und Traumagruppe beobachtet werden (Abb. 7 A+B).

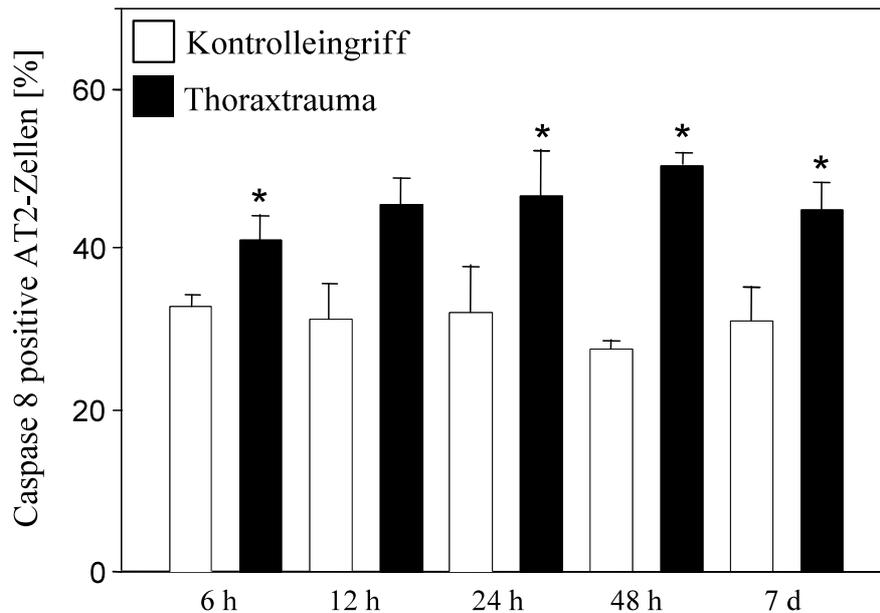


Abb. 6: Mittlere Prozentzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) im rechten Mittellappen von männlichen Sprague Dawley Ratten 6, 12, 24, 48 Stunden (h) und 7 Tage (d) nach Kontrolleingriff oder stumpfem Thoraxtrauma (n=4-5/Gruppe). Die Lungen wurden mit dem Caspase 8-Antikörper (Dianova, Hamburg) gefärbt. Bei 630-facher Vergrößerung wurden 200 AT2-Zellen nach Morphologie und Lage charakterisiert und der Prozentsatz an Caspase 8 positiven AT2-Zellen bestimmt. *p<0,05 vs. zugehörigem Kontrollzeitpunkt, t-test, Mittelwert ± Standardfehler.

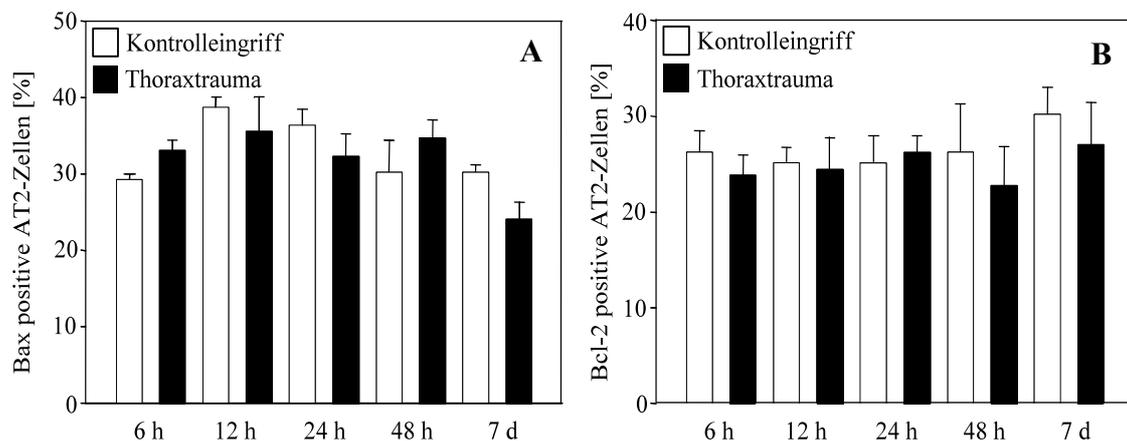


Abb. 7 A+B: Mittlere Prozentzahl von Bax bzw. Bcl-2 positiven Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) im rechten Mittellappen von männlichen Sprague Dawley Ratten 6, 12, 24, 48 Stunden (h) und 7 Tage (d) nach Kontrolleingriff oder stumpfem Thoraxtrauma (n=4-5/Gruppe). Die Lungen wurden in **A** mit dem Bax-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), in **B** mit dem Bcl-2-Antikörper (PharMingen, San Diego, USA) gefärbt. Bei 630-facher Vergrößerung wurden 200 AT2-Zellen nach Morphologie und Lage charakterisiert und der Prozentsatz an Bax bzw. Bcl-2 positiven AT2-Zellen bestimmt. Mittelwert ± Standardfehler.

3.2 ELISA

IL-1 β und löslicher Fas-Ligand sind in der Literatur als potentielle Induktoren von Apoptose beschrieben. Um Veränderungen in ihren Konzentrationen in der BAL der Versuchstiere nach Kontrolleingriff bzw. Trauma darzulegen, sollten diese proapoptischen Faktoren mittels ELISA-Technik nachgewiesen werden.

3.2.1 IL-1 β ELISA

Es wurden zum Zeitpunkt 24 h nach dem Thoraxtrauma statistisch signifikant erhöhte Konzentrationen an IL-1 β im Vergleich zur zugehörigen Kontrolle in der BAL beobachtet (Abb. 8).

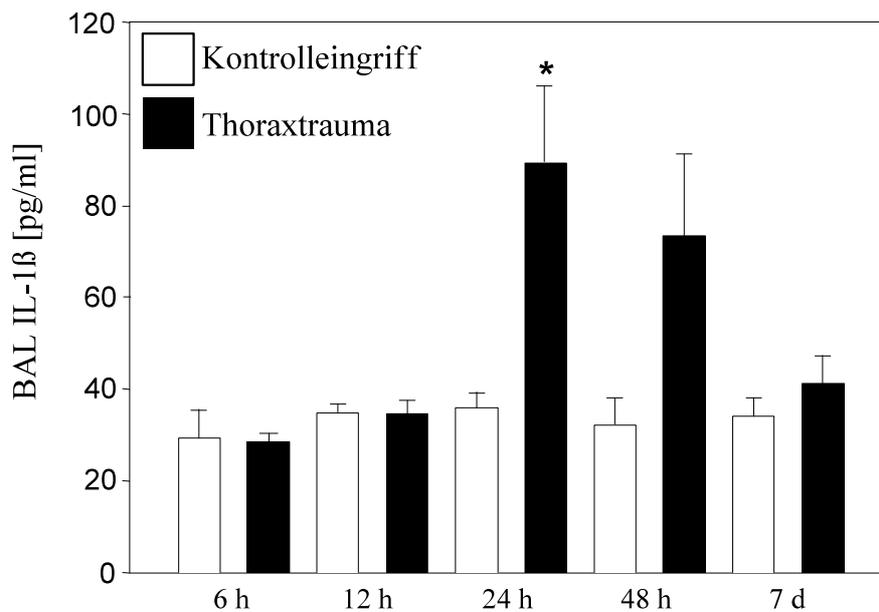


Abb. 8: Enzyme-linked immunosorbent assay (Sandwich-ELISA-Kit, BioSource International, Camarillo, USA) für IL-1 β in der bronchoalveolären Lavage (BAL), isoliert aus Kontroll- und Traumatieren 6, 12, 24, 48 Stunden (h) und 7 Tage (d) nach dem Eingriff (n=5/Gruppe). Die Absorption wurde bei 450 Nanometer (nm, Referenzfilter 570 nm) am Microplate-Reader (Tecan sunrise, Crailsheim) photometrisch gemessen und die Konzentrationen von IL-1 β in Pikogramm/ml (pg/ml) mit Hilfe der aus den Standards berechneten Eichgeraden ermittelt. *p<0,05 vs. zugehörigem Kontrollzeitpunkt, ANOVA on Ranks, Mittelwert \pm Standardfehler.

3.2.2 Löslicher Fas-Ligand ELISA

In der BAL der Versuchstiere fanden sich, im Vergleich zum jeweiligen Kontrollzeitpunkt, 6, 12, 24 und 48 h nach dem Thoraxtrauma signifikant höhere Konzentrationen an löslichem Fas-Ligand. Des Weiteren ergaben sich für den 48 h Traumazeitpunkt Signifikanzen gegenüber 6 h, 12 h und 7 d nach dem Trauma (Abb. 9).

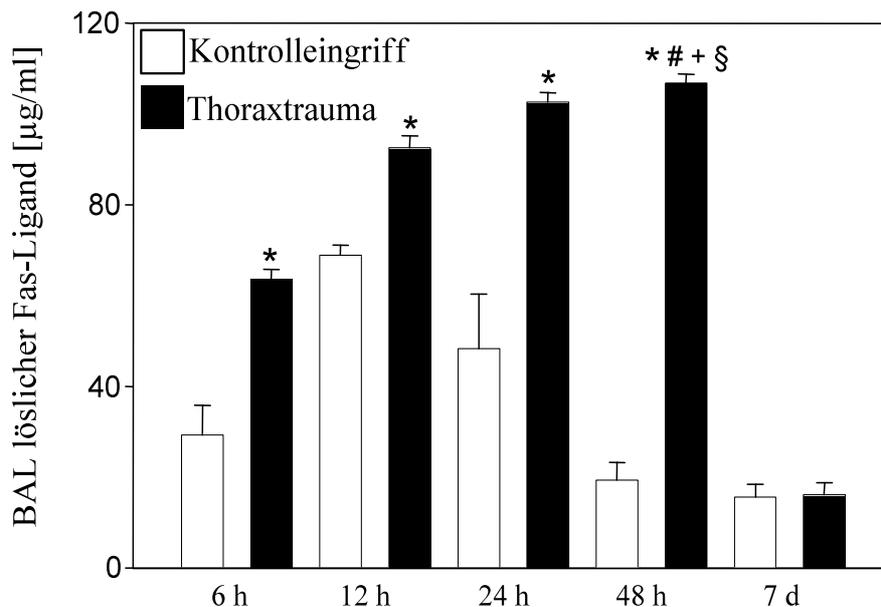


Abb. 9: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, USA) für löslichen Fas-Ligand in der bronchoalveolären Lavage (BAL), isoliert aus Kontroll- und Traumatieren 6, 12, 24, 48 Stunden (h) und 7 Tage (d) nach dem Eingriff (n=5/Gruppe). Die Absorption wurde bei 450 Nanometer (nm, Referenzfilter 570 nm) am Microplate-Reader (Tecan sunrise, Männedorf, Schweiz) photometrisch gemessen und die Konzentrationen von löslichem Fas-Ligand in Mikrogramm/ml ($\mu\text{g/ml}$) mit Hilfe der aus den Standards berechneten Eichgeraden ermittelt. * $p < 0,05$ vs. zugehörigem Kontrollzeitpunkt, # $p < 0,05$ vs. 6 h Thoraxtrauma, + $p < 0,05$ vs. 12 h Thoraxtrauma, § $p < 0,05$ vs. 7 d Thoraxtrauma, ANOVA on Ranks, Mittelwert \pm Standardfehler.

3.3 Koinkubation mit rekombinantem löslichen Fas-Ligand

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um einerseits zu zeigen, dass löslicher Fas-Ligand Apoptose in AT2-Zellen, isoliert aus gesunden Sprague Dawley Ratten, auszulösen vermag und dass diese andererseits auch empfänglich für eine Apoptoseinduktion mittels löslichem Fas-Liganden sind. Bei der Koinkubation der AT2-Zellen mit 3 in ihrer Konzentration aufsteigenden Lösungen von rekombinantem löslichen Fas-Ligand wurde in der Annexin-Färbung konzentrationsabhängig jeweils eine statistisch signifikante Zunahme der apoptotischen Zellen gegenüber der Kontrolle beobachtet (Abb. 10).

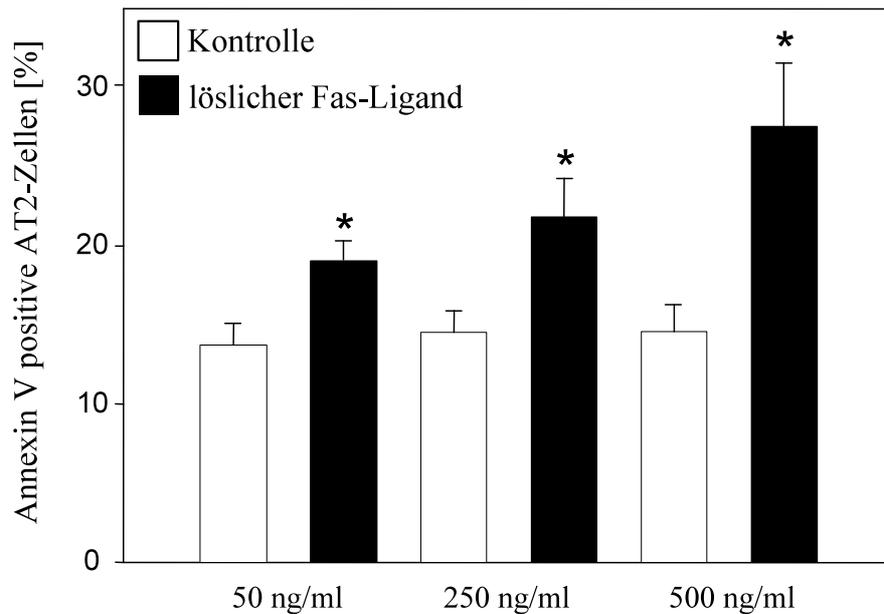


Abb. 10: Kultivierte Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) von gesunden männlichen Sprague Dawley Ratten, kokubiert mit humanem rekombinanten löslichen Fas-Ligand (Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA) der Konzentrationen 50, 250 und 500 Nanogramm/ml (ng/ml) (n=5/Gruppe). Nach 18 Stunden wurden die AT2-Zellen fixiert und mit Annexin V (Hölzel Diagnostika, Köln) gefärbt. Bei 200-facher Vergrößerung wurden jeweils 3 Gesichtsfelder der Schnitte fotografiert (Axio Imager M1, Zeiss, Oberkochen) und der Prozentsatz an Annexin positiven AT2-Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl bestimmt. *p<0,05 vs. zugehöriger Kontrolle, ANOVA on Ranks, Mittelwert ± Standardfehler.

3.4 Alveolarmakrophagenzellzahl

Um einen Einblick in Veränderungen in der Anzahl an Alveolarmakrophagen nach dem Trauma bzw. dem Kontrolleingriff zu gewinnen, wurde sowohl in den immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der Lunge, als auch in der BAL die Alveolarmakrophagenzellzahl bestimmt. Bei der Auswertung der Immunhistochemie wurde in der MNF 116- Färbung, in welcher die Alveolarmakrophagen gut zur Darstellung kamen, pro Gesichtsfeld ein signifikanter Anstieg der Zellzahl zum Zeitpunkt 48 h nach dem Thoraxtrauma beobachtet. Die Signifikanz bezieht sich auf die zugehörige Kontrollgruppe sowie auf die Traumagruppe 6 h nach dem Eingriff (Abb. 11A). Ebenso konnten 48 h nach dem Thoraxtrauma signifikant mehr Alveolarmakrophagen aus der BAL isoliert werden, als bei der 48 h Kontrollgruppe sowie der 4 und 24 h Traumagruppe (Abb. 11B).

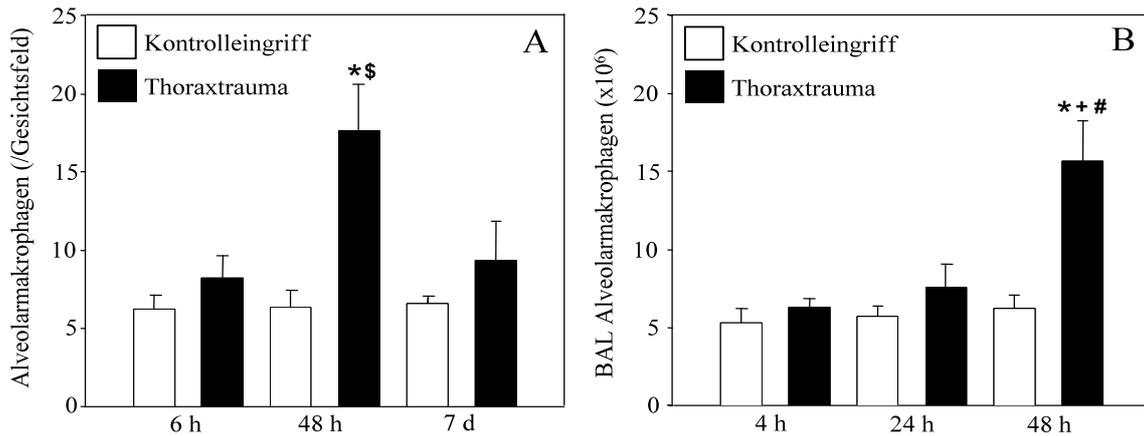


Abb. 11A: Mittlere Anzahl von Alveolarmakrophagen im rechten Mittellappen von männlichen Sprague Dawley Ratten 6, 48 Stunden (h) und 7 Tage (d) nach Kontrolleingriff oder stumpfem Thoraxtrauma (n=4-5/Gruppe). Die Lungen wurden mit dem Antizytokeratinantikörper MNF 116 (DakoCytomation, Carpinteria, USA) immunhistochemisch gefärbt und mit Hämatoxyllin gegengefärbt. In 20 Gesichtsfeldern (630 × Vergrößerung) wurde unter Berücksichtigung der Lokalisation und der für Alveolarmakrophagen typischen Morphologie wie ovaler Zellkern, diffuses Kernchromatin sowie variable Anzahl an zytoplasmatischen Vakuolen die Anzahl der Alveolarmakrophagen pro Gesichtsfeld bestimmt, um daraus einen Mittelwert zu bilden. *p<0,05 vs. 48 h Kontrollgruppe, \$p<0,05 vs. 6 h Thoraxtrauma, t-test, Mittelwert ± Standardfehler.

Abb. 11B: Anzahl der Alveolarmakrophagen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von männlichen Sprague Dawley Ratten 4, 24 und 48 h nach Kontrolleingriff oder stumpfem Thoraxtrauma (n=5/Gruppe). Dazu wurden die Zellen mit Trypanblau (Sigma-Aldrich) gefärbt und die Zellzahl mittels einer Neubauer Zahlkammer bestimmt. *p<0,05 vs. 48 h Kontrolltier, +p<0,05 vs. 24 h Thoraxtrauma, #p<0,05 vs. 4 h Thoraxtrauma, ANOVA on Ranks, Mittelwert ± Standardfehler.

3.5 Koinkubation mit Kulturüberständen von Alveolarmakrophagen

Um einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Anzahl an Alveolarmakrophagen und der Apoptoseinduktion in AT2-Zellen aufzuzeigen, wurden diese aus unbehandelten männlichen Sprague Dawley Ratten isoliert und mit Kulturüberständen von Alveolarmakrophagen koinkubiert. Der Versuchsansatz wurde jeweils mit und ohne H₂O₂ durchgeführt, um den zusätzlichen Einfluss des, durch das H₂O₂ verursachten oxidativen Stresses auf die Apoptoserate der AT2-Zellen zu überprüfen.

Hierbei konnte lediglich im Versuchsansatz mit 0,5 mM H₂O₂ als oxidativem Stressor in der Annexin V Färbung zum Zeitpunkt 48 h nach dem Thoraxtrauma ein signifikanter Anstieg an apoptotischen Zellen im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle beobachtet werden (Abb. 12 A+B+C).

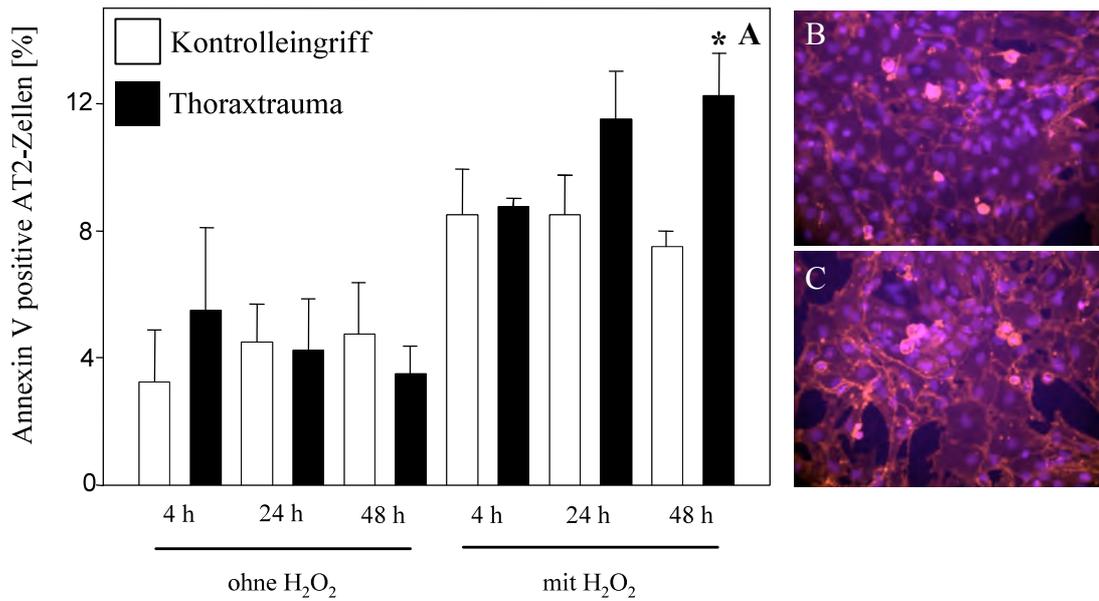


Abb. 12 A: Apoptosenachweis in Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) von gesunden Sprague Dawley Ratten, koinkubiert mit Überständen von Alveolarmakrophagen isoliert aus Kontroll- und Traumatieren 4, 24 und 48 Stunden (h) nach dem Eingriff jeweils mit und ohne 0,5 Millimol (mM) Wasserstoffperoxid (H₂O₂, n=3-4/Gruppe). Nach 6 h wurden die AT2-Zellen fixiert und mit Annexin V (Hölzel Diagnostika, Köln) gefärbt. Bei 200-facher Vergrößerung wurden jeweils 3 Gesichtsfelder der Schnitte fotografiert (Axio Imager M1, Zeiss, Oberkochen) und der Prozentsatz an Annexin V positiven AT2-Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl bestimmt. *p<0,05 vs. zugehöriger Kontrolle, ANOVA on Ranks, Mittelwert ± Standardfehler.

Abb. 12 B+C: Annexinnachweis in Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) nach der Koinkubation (wie in 12 A beschrieben). Traumagruppe, 24 Stunden (h), ohne (oben) und mit (unten) 0,5 mM Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Die Zellen wurden mit Annexin V (Hölzel Diagnostika, Köln) gefärbt und bei 200-facher Vergrößerung fotografiert (Axio Imager M1, Zeiss, Oberkochen).

Zu allen anderen Zeitpunkten zeigten sich sowohl in der Annexin V, als auch in der TUNEL-Färbung bei keinem der Versuchansätze Unterschiede in der Anzahl an apoptotischen AT2-Zellen zwischen Kontroll- und Traumagruppe (Abb. 13 A+B).

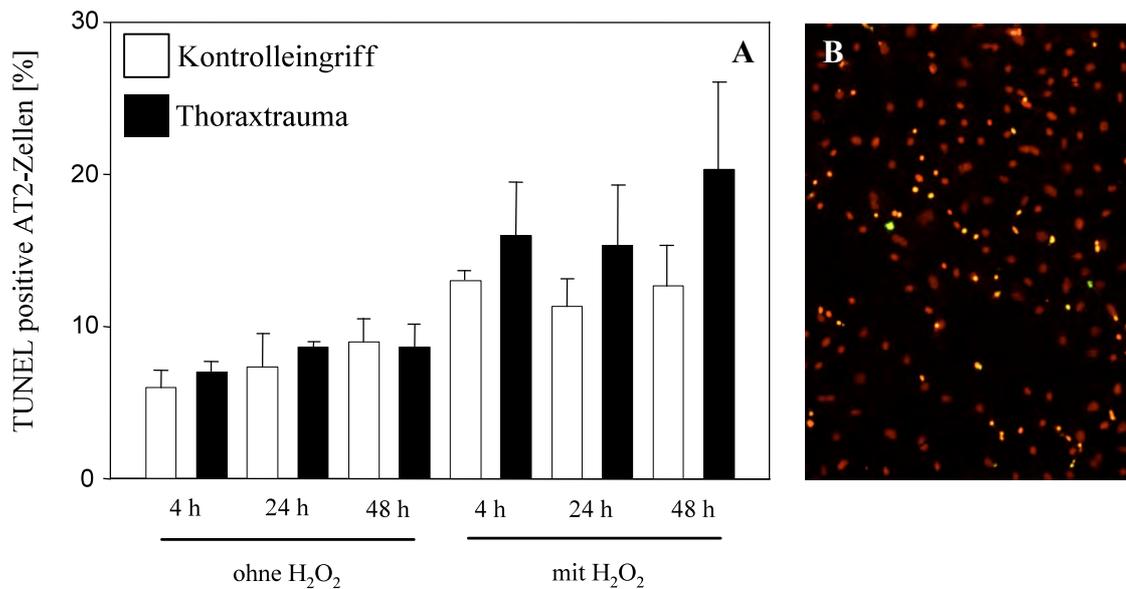


Abb. 13 A: Apoptosenachweis in Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) von gesunden Sprague Dawley Ratten, koinkubiert mit Überständen von Alveolarmakrophagen isoliert aus Kontroll- und Traumatieren 4, 24 und 48 Stunden (h) nach dem Eingriff jeweils mit und ohne 0,5 Millimol (mM) H₂O₂ (n=3/Gruppe). Nach 6 h wurden die AT2-Zellen fixiert und mit Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL, APO-direct-Kit, Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, USA) gefärbt. Bei 200-facher Vergrößerung wurden jeweils 3 Gesichtsfelder der Schnitte fotografiert (Axio Imager M1, Zeiss, Oberkochen) und der Prozentsatz an TUNEL positiven AT2-Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl bestimmt. Mittelwert ± Standardfehler.

Abb. 13 B: TUNEL-Nachweis in Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) nach der Koinkubation (wie in 13 A beschrieben). Traumagruppe, 4 Stunden (h) mit 0,5 mM Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Die Zellen wurden mit TUNEL (APO-direct-Kit, Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, USA) gefärbt und bei 200-facher Vergrößerung fotografiert (Axio Imager M1, Zeiss, Oberkochen).

4 Diskussion

4.1 Führt ein stumpfes Thoraxtrauma zur Induktion von Apoptose in AT2-Zellen

Die Fragestellung der Studie war, ob ein stumpfes Thoraxtrauma Apoptose in AT2-Zellen induziert und welche Faktoren bei diesem Prozess eine Rolle spielen.

Zunächst wurden die Lungen der traumatisierten und der kontrollierten Tiere mit MNF 116, einem AT2-zellspezifischen Antikörper gefärbt. Bei der Auswertung dieser Untersuchung wurde zum Zeitpunkt 48 h nach dem Thoraxtrauma in den Lungen der Versuchstiere ein Abfall der AT2-Zellzahl beobachtet. Um nun einen Hinweis zu erhalten, ob diese Reduktion apoptotischen Ursprungs ist, wurden die Schnitte mit verschiedenen Antikörpern, die auf einen apoptotischen Signalweg hindeuten gefärbt. So zeigte sich, dass der Abfall der AT2-Zellzahl von einem signifikanten Anstieg an aktiven Caspase 3 positiven Zellen in den verbleibenden AT2-Zellen begleitet wurde. In vivo waren zusätzlich Caspase 8 positive AT2-Zellen 6, 24, 48 h und 7 d bzw. Fas positive AT2-Zellen 12, 24, 48 h und 7 d nach der Lungenkontusion signifikant vermehrt im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Apoptose als Form des Zelltodes zu der beobachteten Reduktion der AT2-Zellzahl beiträgt.

Unterstützt wird diese Hypothese auch durch in der Literatur beschriebene Beobachtungen, dass die Apoptose von AT2-Zellen in der Pathogenese von ALI und ARDS eine Rolle spielt ^{31,53,58,61,84,95} und somit auch zu der Entwicklung der respiratorischen Insuffizienz nach einem stumpfen Thoraxtrauma beitragen könnte.

4.2 Die Bedeutung der beschriebenen Signalwege der Apoptose in Bezug auf das stumpfe Thoraxtrauma

Wie in Kapitel 1.3.2. erwähnt, sind in der Literatur verschiedene Signalwege des apoptotischen Zelltodes beschrieben. Als die beiden wichtigsten gelten der extrinsische und der intrinsische Signalweg, welche über Fas und Fas-Ligand bzw. über Mitglieder der Bcl-Familie reguliert werden ^{46,52,68,99}. Um zu untersuchen, welcher der Signalwege bei der Apoptose der AT2-Zellen nach einem Thoraxtrauma involviert ist, wurde das Lungengewebe zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Thoraxtrauma bzw. dem Kontrolleingriff immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Fas, Fas-Ligand, Caspase 8, Bax und Bcl-2 gefärbt.

Als Hinweis auf den extrinsischen Signalweg war bei den traumatisierten Tieren nach 12, 24, 48 h und 7 d im Vergleich zu den kontrollierten Tieren ein signifikanter Anstieg an Fas-positiv gefärbten AT2-Zellen zu beobachten. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei der Färbung auf Fas-Ligand und Caspase 8 gefunden, welche ebenso Bestandteile des extrinsischen Signalweges darstellen.

Diese Resultate decken sich mit vorausgegangenen Studien, in denen von einem signifikanten Anstieg von Fas und Fas-Ligand positiven AT2-Zellen bei Patienten mit ARDS bzw. ALI berichtet wurde^{2,53}. Wang et al. beschrieben den Fas/Fas-Ligand Signalweg als wichtigen Mechanismus zur Regulierung von Zellzahlen in der Lunge⁹⁶. Somit steigt zum Beispiel nach Polysaccharid-induzierter ALI in Ratten die Fas/Fas-Ligand vermittelte AT2-Zellapoptose 7 d nach dem Eingriff an. Hierbei scheinen sowohl die lösliche, als auch die membrangebundene Form des Fas-Liganden mit involviert zu sein⁹⁶, die somit beide zur Apoptoseinduktion befähigt sind^{55,87}. Die Bedeutung dieses Signalweges wird des Weiteren hervorgehoben durch die Tatsache, dass erhöhte Fas-Ligand Konzentrationen einen prognostischen Faktor bezüglich der Mortalität durch ARDS darstellen⁵³. In diesem Zusammenhang beobachteten Matute-Bello et al., dass Fas und Fas-Ligand bei Patienten mit ARDS, insbesondere bei letalem Ausgang, hochreguliert werden⁵⁵.

Bei der Bax und der Bcl-2 Färbung hingegen ließen sich keine Unterschiede zwischen traumatisierten und kontrollierten Tieren nachweisen. In diesem Zusammenhang scheint Bax also nur eine untergeordnete Rolle im Respirationstrakt zu spielen. Krajewski et al. zeigten in einer Studie, dass dieses Protein im Lungengewebe von gesunden Mäusen im Vergleich zu anderen Geweben, wie im Nerven-, Fortpflanzungs- und endokrinen System, unterexprimiert ist⁴².

Im Gegensatz dazu existieren jedoch auch Studien, bei denen in kontusionierten Lungen erhöhte Bax und erniedrigte Bcl-2 Konzentrationen gefunden wurden²⁵. Zusätzlich beschrieben Fehrenbach et al., dass der intrinsische Signalweg einen wichtigen Beitrag zur Auflösung von Epithelzellhyperplasien leistet, welche experimentell in Rattenlungen mittels Keratinozyten Growth Factor induziert wurden²¹.

Welcher Signalweg ursächlich für die Auslösung der Apoptose ist scheint somit abhängig vom jeweiligen Modell zu sein. Somit bestätigen die Ergebnisse durchaus das Konzept, dass die Apoptose von AT2-Zellen in Rattenlungen bei einem stumpfen Thoraxtrauma über den extrinsischen Signalweg reguliert wird.

4.3 Der Zusammenhang zwischen den erhöhten IL-1 β und Fas-Ligand Konzentrationen in der BAL und der Apoptose in AT2-Zellen

Da die AT2-Zellen dem intraalveolären Milieu ausgesetzt sind, wurden in der BAL mittels ELISA-Technik die Konzentrationen von IL-1 β und löslichem Fas-Ligand bei traumatisierten und kontrolloperierten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem jeweiligen Eingriff bestimmt. Dabei zeigte sich zum Zeitpunkt 24 h nach dem Thoraxtrauma ein signifikanter Anstieg der IL-1 β Konzentration. In der Literatur wird dieses Zytokin als Apoptoseinduktor in den verschiedensten Zelltypen beschrieben^{9,16,98}. So induziert z.B. die Behandlung von Schilddrüsenzellen mit IL-1 β die Aktivierung von Caspase 3 und damit des apoptotischen Signalweges. Auch in β -Zellen des Pankreas führt IL-1 β in Zusammenhang mit anderen Zytokinen zur Apoptose⁹. Dabei setzen aktivierte Makrophagen IL-1 β als eines von verschiedensten Zytokinen frei^{9,29}. Desweiteren zeigten Hybertson et al., dass die intratracheale Applikation von IL-1 β zu vermehrtem oxidativen Stress und damit auch zu einer gesteigerten Apoptoserate in AT2-Zellen führt³⁰. In den beschriebenen Modellen wird die Apoptose jedoch über intrazelluläre Komponenten und nicht über den extrinsischen Signalweg getriggert. Daher ist in Frage zu stellen, ob die nachgewiesene erhöhte Konzentration von IL-1 β in der BAL der traumatisierten Tiere einen wesentlichen Effekt auf die Induktion des apoptotischen Zelltodes hat. Vielmehr scheint dies eine Folge der inflammatorischen Begleitreaktion des Lungengewebes zu sein. Auch der proapoptotische lösliche Fas-Ligand war in der BAL der traumatisierten Tiere zu den Zeitpunkten 6, 12, 24 und 48 h nach dem Thoraxtrauma signifikant erhöht. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Studie von Matute-Bello et al., die eine erhöhte Konzentration an löslichem Fas-Ligand bei Patienten mit ARDS fanden⁵⁵. Die Bedeutung dieses Mediators für eine späte Apoptoseinduktion nach einer Lungenkontusion wird hervorgehoben durch die beobachtete Zeitabhängigkeit der Konzentration von löslichem Fas-Ligand nach dem Thoraxtrauma. Sie ist zum Zeitpunkt 48 h nach dem Trauma signifikant höher im Vergleich zu den Werten aus der 6 h und 12 h Traumagruppe.

4.4 Auswirkungen des löslichen Fas-Liganden auf die kultivierten AT2-Zellen

In der Literatur werden dem löslichen Fas-Liganden ebenso wie der membrangebundenen Form proapoptotische Eigenschaften zugeschrieben^{55,87}. Bei der Koinkubation der aus gesunden männlichen Sprague Dawley Ratten isolierten AT2-Zellen mit aufsteigenden

Konzentrationen an rekombinatem löslichen Fas-Ligand wurde in der Annexin V Färbung wie erwartet eine konzentrationsabhängige und jeweils statistisch signifikante Zunahme der apoptotischen Zellen beobachtet. Dieser Versuch verdeutlicht einerseits, dass löslicher Fas-Ligand tatsächlich eine apoptotische Reaktion zu induzieren vermag. Andererseits deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die im weiteren Verlauf verwendete AT2-Zellkultur Fas-Rezeptoren exprimiert und somit sensibel für den Fas/Fas-Ligand vermittelten Signalweg ist.

4.5 Einfluss der verschiedenen Zelltypen auf die Apoptoseinduktion

Hier stellte sich nun die Frage, ob die Alveolarmakrophagen oder andere in der BAL befindliche Zelltypen mit der Apoptoseinduktion in Zusammenhang stehen.

Matute-Bello et al. beschrieben, dass Fas-Ligand auf Alveolarmakrophagen exprimiert wird und diese somit als Ursprung für die Einleitung des extrinsischen Signalweges dienen könnten⁵⁵. Durch die Spaltung des Fas-Ligand mittels Metalloproteinasen entsteht löslicher Fas-Ligand, der ebenso Apoptose in empfänglichen Zellen zu induzieren vermag^{55,58,87}. Auch aus Monozyten entstandene Makrophagen enthalten löslichen Fas-Ligand, welcher nach einer Zellaktivierung mittels Phytohämagglutinin, Immunkomplexen und Superantigenen in vitro rasch freigesetzt werden kann^{36,37,58}. Dies lässt vermuten, dass die Alveolarmakrophagen für den Vorgang der Apoptoseinduktion mitverantwortlich sein könnten und tatsächlich zeigt die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des Lungengewebes die Tendenz, dass zum Zeitpunkt 48 h nach dem Thoraxtrauma signifikant mehr Alveolarmakrophagen im Alveolarepithel bzw. in den Alveolen zu sehen sind.

Diese Vermutung wurde durch eine Zählung von aus der BAL isolierten Alveolarmakrophagen bestätigt, da diese 48 h nach der Lungenkontusion im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant vermehrt in der BAL nachzuweisen sind. Diese Vermehrung der Alveolarmakrophagen wird in der Literatur dadurch erklärt, dass parenchymale Lungenmakrophagen im Lungengewebe ein Reservoir an Alveolarmakrophagenvorläufern bilden, welches bei Bedarf rekrutiert werden kann. Dabei werden periphere Monozyten des Blutes als Vorläufer der parenchymalen Lungenmakrophagen betrachtet. Landsman et al. zeigten in einer Studie, dass die peripheren Monozyten des Blutes die ursprünglichen Vorläufer der Alveolarmakrophagen sind⁴⁴. Als Ursache für diese Rekrutierung könnte zum Beispiel die lokale Entzündungsreaktion, die als unmittelbare Folge der Lungenkontusion auftritt, angesehen

werden^{63,67}. Als Folge der Kontusion kommt es schon nach kurzer Zeit zur Sequestration von aktivierten neutrophilen Granulozyten, welche durch zunehmende Degranulation und Freisetzung gewebstoxischer Mediatoren eine Entzündungsreaktion hervorrufen^{27,63,67,88}. Somit ließe sich auch die Vermehrung der Alveolarmakrophagen in der BAL von traumatisierten Tieren erklären^{50,78}. Aber auch die einwandernden neutrophilen Granulozyten könnten die Quelle des löslichen oder membrangebundenen Fas-Ligand bzw. anderer proapoptotischer Faktoren sein⁵⁸. So zeigten Serrao et al., dass neutrophile Granulozyten mittels Freisetzung von löslichem Fas-Ligand ebenso in der Lage sind Apoptose im Alveolarepithel auszulösen⁷⁹.

4.6 Steht die posttraumatische Vermehrung der Alveolarmakrophagen in Zusammenhang mit der Apoptose im Alveolarepithel?

Um nun herauszufinden, ob diese Vermehrung der Alveolarmakrophagen mit der Apoptose der AT2-Zellen in Zusammenhang steht, wurden naive AT2-Zellen mit Kulturüberständen von Alveolarmakrophagen, die jeweils nach dem Thoraxtrauma bzw. dem Kontrolleingriff isoliert wurden, koinkubiert. Dabei konnte in der Annexin V Färbung zum Zeitpunkt 48 h nach dem Thoraxtrauma unter Zusatz von H₂O₂ als oxidativem Stressor ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate der AT2-Zellen beobachtet werden. Die Annexin V Färbung, die gegen Phosphatidylserin auf der Membranoberfläche gerichtet ist, gilt als sehr spezifisch und gibt die Möglichkeit schon zu frühen Zeitpunkten apoptotische Zellen nachzuweisen⁹⁵. Die TUNEL-Färbung hingegen ließ keine Veränderungen in der Anzahl der apoptotischen Zellen erkennen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass TUNEL bekanntermaßen erst in späten Stadien des Apoptosevorganges maximal positiv wird²³. Eine Koinkubationsdauer von 6 h mit dem proapoptotischen Stimulus könnte somit für eine aussagekräftige TUNEL-Färbung zu kurz sein, so dass nachweisbare Abweichungen in der Apoptoserate schon verloren gegangen sein könnten.

Diese Ergebnisse deuten also darauf hin, dass jene Alveolarmakrophagen, die durch ein stumpfes Thoraxtrauma aktiviert wurden, in vitro in der Lage sind Apoptose in AT2-Zellen auszulösen, wenn diese dafür sensitiviert werden. Ein möglicher Faktor, der diese Sensitivierung der AT2-Zellen auf proapoptotische Signale bewirkt, könnte der durch die Zugabe von H₂O₂ zur Zellkultur ausgelöste oxidative Stress sein. Oxidativen Stress im Lungengewebe nach einer Kontusion findet man sowohl in experimentellen Studien als auch im Menschen²⁴. Somit hat sich oxidativer Stress als wichtiger Apoptoseinduktor in

Zellen des Lungengewebes herausgebildet ^{35,48,97}. Des Weiteren führt die experimentelle Hemmung von Antioxidantien zu einem ansteigenden Zelltod in der Lunge ⁶.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Alveolarmakrophagen Mediatoren freisetzen, die in Zusammenhang mit dem die Kontusion begleitenden oxidativen Stress, Apoptose in AT2-Zellen auszulösen vermögen. Hierfür kommt zum Beispiel löslicher Fas Ligand, der in der BAL von traumatisierten Tieren in erhöhter Konzentration vorzufinden ist, aber auch TNF- α und weitere Zytokine in Frage.

5 Zusammenfassung

Die Apoptose von Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) in der Lunge spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungen, Verletzungen, aber auch bei der Regeneration des Lungengewebes. Vorangehende Studien zeigten bereits, dass ein stumpfes Thoraxtrauma zur Aktivierung von Entzündungszellen wie Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten führt, woraus eine entzündliche Reaktion resultiert. Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung verschiedener intraalveolärer Komponenten (Alveolarmakrophagen, bronchoalveoläre Lavage (BAL)), die an der Induktion des apoptotischen Signalweges nach einem stumpfen Thoraxtrauma beteiligt zu sein scheinen.

Dazu wurden männliche Sprague Dawley Ratten einem stumpfen Thoraxtrauma, welches mittels einer Druckwelle induziert wurde, bzw. einem Kontrolleingriff unterzogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Eingriff (6 Stunden bis 7 Tage) wurde das Lungengewebe immunhistochemisch mit Hilfe einer AT2-zellspezifischen Färbung bzw. mit Antikörper gerichtet gegen aktive Caspase 3, Caspase 8, Fas, Fas-Ligand, Bax und Bcl-2 analysiert. Des Weiteren wurden die Konzentrationen von Interleukin-1 β (IL-1 β) und löslichem Fas-Ligand in der BAL bestimmt und eine Koinkubation von AT2-Zellen mit einem rekombinanten humanen löslichen Fas-Ligand durchgeführt. Schließlich wurden noch die aus den Lungen gesunder Versuchstiere isolierten AT2-Zellen mit den Überständen von Alveolarmakrophagen, die aus der BAL von traumatisierten bzw. kontrolloperierten Tieren gewonnen wurde, koinkubiert. Zur Identifizierung der apoptotischen Zellen wurden die Färbungen Annexin V und Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) herangezogen. Die histologische Beurteilung der Lungengewebsschnitte zeigte eine signifikante Reduktion der AT2-Zellzahl zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Thoraxtrauma. In den Färbungen gegen aktive Caspase 3, Caspase 8, Fas und Fas-Ligand wurden bei den traumatisierten im Vergleich zu den kontrolloperierten Tieren signifikant mehr positive AT2-Zellen gefunden, während bei Bax und Bcl-2 keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Traumatieren beobachtet wurde. Die Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) brachten bei den Traumatieren erhöhte Konzentrationen an IL-1 β zum Zeitpunkt 24 Stunden nach dem Thoraxtrauma und an löslichem Fas-Ligand zu den Zeitpunkten 6, 12, 24 und 48 Stunden nach der Verletzung zum Vorschein. Mit Hilfe der Annexin V Färbung konnte bei der Koinkubation der AT2-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des rekombinanten löslichen Fas-Ligand ein konzentrationsabhängiger und signifikanter Anstieg an apoptotischen AT2-Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde auch bei der

Koinkubation der AT2-Zellen mit Kulturüberständen von Alveolarmakrophagen, die 48 Stunden nach dem Trauma aus den Tieren isoliert wurden apoptotischen Zellen beobachtet.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass bei einer durch ein stumpfes Thoraxtrauma induzierten Lungenkontusion apoptotischer Zelltod stattfindet. Die Studie zeigt, dass die extrinsisch aktivierte Signalkaskade dabei eine wesentlich größere Rolle spielt, als es bei der intrinsischen der Fall ist. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass von den Alveolarmakrophagen freigesetzte Mediatoren an der Auslösung der Apoptose beteiligt sind, wobei diesbezüglich jedoch noch weitere Untersuchungen durchzuführen sind.

6 Literaturverzeichnis

1. Adamson IY, Bowden DH. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest* 1974;30:35-42.
2. Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman GA, Matthay MA, Ware LB. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Pathol* 2002;161:1783-1796.
3. Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *Am J Pathol* 1996;149:845-852.
4. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D. Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. *AG Polytrauma of DGU. Unfallchirurg* 2000;103:355-363.
5. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996;85:803-815.
6. Brown LA, Harris FL, Jones DP. Ascorbate deficiency and oxidative stress in the alveolar type II cell. *Am J Physiol* 1997;273:L782-L788.
7. Chertkova RV, Sharonov GV, Feofanov AV, Bocharova OV, Latypov RF, Chernyak BV, Arseniev AS, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP. Proapoptotic activity of cytochrome c in living cells: effect of K72 substitutions and species differences. *Mol Cell Biochem* 2008.
8. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505-512.
9. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 2005;54 Suppl 2:S97-107.
10. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:126-130.
11. Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, Fitzgerald P, Guio-Carrion A, Waterhouse NJ, Li CW, Mari B, Barbry P, Newmeyer DD, Beere HM, Green DR. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 2007;129:983-997.
12. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:332-337.

13. Davis KA, Fabian TC, Croce MA, Proctor KG. Prostanoids: early mediators in the secondary injury that develops after unilateral pulmonary contusion. *J Trauma* 1999;46:824-831.
14. Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis* 1986;134:141-145.
15. Dosreis GA, Borges VM, Zin WA. The central role of Fas-ligand cell signaling in inflammatory lung diseases. *J Cell Mol Med* 2004;8:285-293.
16. El BH, Rath G, Morjani H, Schneider C, Petitfrere E, Antonicelli F, Martiny L. Interleukin-1beta-induced apoptosis through adenylyl cyclase and ERK1/2 inhibition in primary cultured thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:469-476.
17. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:663-698.
18. Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G. Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol* 1975;22:142-150.
19. Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G. Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. *Am J Pathol* 1973;70:175-198.
20. Fattman CL. Apoptosis in pulmonary fibrosis: too much or not enough? *Antioxid Redox Signal* 2008;10:379-385.
21. Fehrenbach H, Kasper M, Koslowski R, Pan T, Schuh D, Muller M, Mason RJ. Alveolar epithelial type II cell apoptosis in vivo during resolution of keratinocyte growth factor-induced hyperplasia in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000;114:49-61.
22. Gaillard M, Herve C, Mandin L, Raynaud P. Mortality prognostic factors in chest injury. *J Trauma* 1990;30:93-96.
23. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
24. Gorbunov NV, Elsayed NM, Kisin ER, Kozlov AV, Kagan VE. Air blast-induced pulmonary oxidative stress: interplay among hemoglobin, antioxidants, and lipid peroxidation. *Am J Physiol* 1997;272:L320-L334.
25. Guinee D, Jr., Brambilla E, Fleming M, Hayashi T, Rahn M, Koss M, Ferrans V, Travis W. The potential role of BAX and BCL-2 expression in diffuse alveolar damage. *Am J Pathol* 1997;151:999-1007.
26. Haley PJ, Muggenburg BA, Weissman DN, Bice DE. Comparative morphology and morphometry of alveolar macrophages from six species. *Am J Anat* 1991;191:401-407.
27. Hellinger A, Konerding MA, Malkusch W, Obertacke U, Redl H, Bruch J, Schlag G. Does lung contusion affect both the traumatized and the noninjured lung

- parenchyma? A morphological and morphometric study in the pig. *J Trauma* 1995;39:712-719.
28. Hoff SJ, Shotts SD, Eddy VA, Morris JA, Jr. Outcome of isolated pulmonary contusion in blunt trauma patients. *Am Surg* 1994;60:138-142.
 29. Hunninghake GW, Glazier AJ, Monick MM, Dinarello CA. Interleukin-1 is a chemotactic factor for human T-lymphocytes. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:66-71.
 30. Hybertson BM, Lee YM, Cho HG, Cho OJ, Repine JE. Alveolar type II cell abnormalities and peroxide formation in lungs of rats given IL-1 intratracheally. *Inflammation* 2000;24:289-303.
 31. Ingbar DH. Mechanisms of repair and remodeling following acute lung injury. *Clin Chest Med* 2000;21:589-616.
 32. Inthorn D, Huf R. Thoracic trauma in multiple trauma. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1992;27:498-501.
 33. Irwin RJ, Lerner MR, Bealer JF, Brackett DJ, Tuggle DW. Cardiopulmonary physiology of primary blast injury. *J Trauma* 1997;43:650-655.
 34. Jaffin JH, McKinney L, Kinney RC, Cunningham JA, Moritz DM, Kraimer JM, Graeber GM, Moe JB, Salander JM, Harmon JW. A laboratory model for studying blast overpressure injury. *J Trauma* 1987;27:349-356.
 35. Janssen YM, Soutanakis R, Steece K, Heerdt E, Singh RJ, Joseph J, Kalyanaraman B. Depletion of nitric oxide causes cell cycle alterations, apoptosis, and oxidative stress in pulmonary cells. *Am J Physiol* 1998;275:L1100-L1109.
 36. Kiener PA, Davis PM, Rankin BM, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Starling GC, Liles WC. Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. *J Immunol* 1997;159:1594-1598.
 37. Kiener PA, Davis PM, Starling GC, Mehlin C, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Liles WC. Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. *J Exp Med* 1997;185:1511-1516.
 38. Kluck RM, Bossy-Wetzl E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-1136.
 39. Knöferl MW, Angele MK, Catania RA, Diodato MD, Bland KI, Chaudry IH. Immunomodulatory effects of dehydroepiandrosterone in proestrus female mice after trauma-hemorrhage. *J Appl Physiol* 2003;95:529-535.
 40. Knöferl MW, Liener UC, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, Gebhard F. Blunt chest trauma induces delayed splenic immunosuppression. *Shock* 2004;22:51-56.
 41. Knöferl MW, Liener UC, Seitz D, Brückner UB, Kinzl L, Gebhard F. Cardiopulmonary and inflammatory alterations following lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock* 2002;6: 519-525.

42. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang HG, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 1994;145:1323-1336.
43. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 2003;171:4672-4679.
44. Landsman L, Jung S. Lung Macrophages Serve as Obligatory Intermediate between Blood Monocytes and Alveolar Macrophages. *J Immunol* 2007;179:3488-3494.
45. Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 1988;141:2629-2634.
46. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
47. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489.
48. Li Y, Zhang W, Mantell LL, Kazzaz JA, Fein AM, Horowitz S. Nuclear factor-kappaB is activated by hyperoxia but does not protect from cell death. *J Biol Chem* 1997;272:20646-20649.
49. Liacos C, Konstadoulakis MM, Economou V, Katsaragakis S, Chatzigianni E, Georgiadis GG, Prekates A, Karampinis A, Bramis J. Increased apoptosis in the alveolar microenvironment of the healthy human lung. *J Surg Res* 2008;145:186-191.
50. Liener UC, Huber-Lang M, Knöferl MW, Kurz M, Brückner B, Kinzl L, Gebhard F. Does blunt chest trauma alter the function of alveolar macrophages? *Shock* 2002;18[suppl.]:16.
51. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157.
52. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997;89:175-184.
53. Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:184-188.
54. Matute-Bello G, Liles WC, Frevert CW, Nakamura M, Ballman K, Vathanaprida C, Kiener PA, Martin TR. Recombinant human Fas ligand induces alveolar epithelial cell apoptosis and lung injury in rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L328-L335.
55. Matute-Bello G, Liles WC, Steinberg KP, Kiener PA, Mongovin S, Chi EY, Jonas M, Martin TR. Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *J Immunol* 1999;163:2217-2225.

56. Matute-Bello G, Martin TR. Science review: apoptosis in acute lung injury. *Crit Care* 2003;7:355-358.
57. Meisenholder GW, Martin SJ, Green DR, Nordberg J, Babior BM, Gottlieb RA. Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection. *J Biol Chem* 1996;271:16260-16262.
58. Mizuta M, Nakajima H, Mizuta N, Kitamura Y, Nakajima Y, Hashimoto S, Matsuyama H, Shime N, Amaya F, Koh H, Ishizaka A, Magae J, Tanuma SI, Hashimoto S. Fas ligand released by activated monocytes causes apoptosis of lung epithelial cells in human acute lung injury model in vitro. *Biol Pharm Bull* 2008;31:386-390.
59. Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma* 1996;40:501-510.
60. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 1995;16:39-43.
61. Neff TA, Guo RF, Neff SB, Sarma JV, Speyer CL, Gao H, Bernacki KD, Huber-Lang M, McGuire S, Hoesel LM, Riedemann NC, Beck-Schimmer B, Zetoune FS, Ward PA. Relationship of acute lung inflammatory injury to Fas/FasL system. *Am J Pathol* 2005;166:685-694.
62. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, . Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376:37-43.
63. Obertacke U, Redl H; Schlag G; Schmit-Neuerburg KP. Lokale und systemische Reaktionen nach Lungenkontusion. Eine experimentelle und klinische Studie. In: Schweiberer L, Tscherne H (Hrsg) Hefte zu der Unfallchirurgie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1994;240:1-91.
64. Obertacke U, Neudeck F, Majetschak M, Hellinger A, Kleinschmidt C, Schade FU, Hogasen K, Jochum M, Strohmeier W, Thurnher M, Redl H, Schlag G. Local and systemic reactions after lung contusion: an experimental study in the pig. *Shock* 1998;10:7-12.
65. Obertacke U, Redl H, Schlag G, Schmit-Neuerburg KP. Lokale und systemische Reaktionen nach Lungenkontusion. Hefte zu Der Unfallchirurg 1994;240.
66. Pape HC, Auf'm Kolk M, Paffrath T, Regel G, Sturm JA, Tscherne H. Primary intramedullary femur fixation in multiple trauma patients with associated lung contusion--a cause of posttraumatic ARDS? *J Trauma* 1993;34:540-547.
67. Perl M, Gebhard F, Brückner UB, Ayala A, Braumüller S, Büttner C, Kinzl L, Knöferl MW. Pulmonary contusion causes impairment of macrophage and lymphocyte immune functions and increases mortality associated with a subsequent septic challenge. *Crit Care Med* 2005;33:1351-1358.
68. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 1998;10:545-551.

69. Phelps DS, Floros J. Localization of surfactant protein synthesis in human lung by in situ hybridization. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:939-942.
70. Pinilla JC. Acute respiratory failure in severe blunt chest trauma. *J Trauma* 1982;22:221-226.
71. Pison U, Max M, Neuendank A, Weissbach S, Pietschmann S. Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system. *Eur J Clin Invest* 1994;24:586-599.
72. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397-400.
73. Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 2001;104:791-800.
74. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-446.
75. Scarpelli EM. The pulmonary surfactant system. *Clin Notes Respir Dis* 1970;9:3-15.
76. Schlag G, Redl H, Pretorius J. Morphology of the lung as a consequence of direct and indirect trauma. In: Schlag G, Redl H (Hrsg) *Pathophysiology of shock, sepsis, and organ failure*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1993:161-175.
77. Schlag G, Redl H, Buchinger W, Dinges HP. Pathophysiologie der Lungenkontusion. *Hefte zur Unfallheilkunde* 1992;233:13-17.
78. Seitz DH, Perl M, Mangold S, Neddermann A, Braumüller ST, Zhou S, Bachem MG, Huber-Lang MS, Knöferl MW. Pulmonary contusion induces alveolar type 2 epithelial cell apoptosis: role of alveolar macrophages and neutrophils. *Shock* 2008;30(5):537-544.
79. Serrao KL, Fortenberry JD, Owens ML, Harris FL, Brown LA. Neutrophils induce apoptosis of lung epithelial cells via release of soluble Fas ligand. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L298-L305.
80. Shorr RM, Crittenden M, Indeck M, Hartunian SL, Rodriguez A. Blunt thoracic trauma. Analysis of 515 patients. *Ann Surg* 1987;206:200-205.
81. Sterbefälle 2006 durch Unfälle, nach Unfallkategorien, Altersgruppen und Geschlecht. Todesursachen in Deutschland. Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2007; Fachserie 12, Serie 4.
82. Stellin G. Survival in trauma victims with pulmonary contusion. *Am Surg* 1991;57:780-784.
83. Strecker W, Gebhard F, Kinzl L. Ermittlung von Verletzungsschwere und -Muster beim individuellen Traumapatienten. In: Schweiberer L, Tscherne H (Hrsg) *Hefte zu der Unfallchirurgie*. Springer: Berlin, Heideberg, New York 1999; 273:1-100.

84. Sutherland LM, Edwards YS, Murray AW. Alveolar type II cell apoptosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001;129:267-285.
85. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000;103:645-654.
86. Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F, Motoyoshi K, Mizuki M, Tagawa S, Ohga S, Hatake K, Drummond AH, Nagata S. Fas ligand in human serum. *Nat Med* 1996;2:317-322.
87. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995;14:1129-1135.
88. Thorley AJ, Ford PA, Giembycz MA, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. Differential Regulation of Cytokine Release and Leukocyte Migration by Lipopolysaccharide-Stimulated Primary Human Lung Alveolar Type II Epithelial Cells and Macrophages. *J Immunol* 2007;178:463-473.
89. Trupka A. Konsequenzen der Früherkennung für die frühe Beatmungstherapie. In: Nast Kolb D, Waydhas C, Schweiberer L (Hrsg) Hefte zu der Unfallchirurgie. Springer: Berlin, Heidelberg, New York 1996;253:11-16.
90. Trupka A, Nast-Kolb D, Schweiberer L. Thoracic trauma. *Unfallchirurg* 1998;101:244-258.
91. Uhal BD. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol* 1997;272:L1031-L1045.
92. Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol* 1998;275:L1192-L1199.
93. Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Biltz R, Morris CF, Housley RM, Pierce GF. Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest* 1994;93:1298-1306.
94. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994;76:777-779.
95. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
96. Wang HC, Shun CT, Hsu SM, Kuo SH, Luh KT, Yang PC. Fas/Fas ligand pathway is involved in the resolution of type II pneumocyte hyperplasia after acute lung injury: evidence from a rat model. *Crit Care Med* 2002;30:1528-1534.
97. Wang L, Medan D, Mercer R, Overmiller D, Leornard S, Castranova V, Shi X, Ding M, Huang C, Rojanasakul Y. Vanadium-induced apoptosis and pulmonary inflammation in mice: Role of reactive oxygen species. *J Cell Physiol* 2003;195:99-107.

98. Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets* 2007;8:493-500.
99. Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: The sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life* 2008;60:390-397.
100. Wright JR. Host defense functions of pulmonary surfactant. *Biol Neonate* 2004;85:326-332.
101. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-556.
102. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132.
103. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405-413.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Mitarbeitern der Abteilung für Unfallchirurgie, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Universität Ulm danken, die mich durch ihre Unterstützung, sowie durch kollegialen Umgang bei der Entstehung dieser Promotion begleitet haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. L. Kinzl und seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. F. Gebhard für die volle Unterstützung dieser Arbeit und die Möglichkeit, in seiner Abteilung meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich des Weiteren bei Herrn Dr. D. Seitz, der mir zu jederzeit sowohl bei der Durchführung der Experimente, als auch bei der schriftlichen Ausarbeitung dieser Promotion hilfreich zur Seite stand.

Auch Herrn Dr. M. Perl gilt mein Dank, der stets ein offenes Ohr für fachliche Fragestellungen und deren Diskussion hatte.

Frau S. Braumüller danke ich dafür, dass sie mir mit ihrer fachlichen Kompetenz, ihrer Geduld und ihrer kameradschaftlichen Art jederzeit zur Hilfe kam und dieses Projekt unaufhörlich und mit aller Kraft unterstützte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. M. Knöferl, der mir als kompetenter Ansprechpartner bei allen fachlichen Problemen stets zur Seite stand. Durch die von ihm vermittelten wissenschaftlichen Grundlagen, die ausführliche Diskussion aufkommender Fragestellungen und seine Förderung zur Eigeninitiative war es mir möglich einen tiefen Einblick in das Tätigkeitsfeld der tierexperimentellen Forschung zu gewinnen. Seine stete Präsenz und Unterstützung hat somit er einen wesentlichen Beitrag zum raschen Gelingen dieser Promotion geleistet.

Zuletzt und meinen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Familie, für die Ermöglichung dieses Studiums und für ihre maximale Unterstützung in jeder Phase meines Lebens und meiner Ausbildung, aussprechen. Ihr ist diese Arbeit in größter Dankbarkeit gewidmet.