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

Auswirkungen eines stumpfen Thoraxtraumas auf die Fas/Fas-Ligand induzierte Inflammationsreaktion der Alveolar-Typ 2 Epithelzellen und Alveolarmakrophagen, sowie deren Phagozytoseaktivität

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

Vorgelegt von
Annette Palmer
aus Erbach
2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Werner Knöferl
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Knippschild
Tag der Promotion : 25. April 2014

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **I**

1 EINLEITUNG **1**

1.1 Bedeutung des stumpfen Thoraxtraumas **1**

1.2 Physiologie des Alveolarraums **2**

1.3 Pathophysiologie des stumpfen Thoraxtraumas **2**

1.4 Apoptose **3**

1.5 Phagozytose und Efferozytose **6**

1.5.1 Zellaktivierung durch Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA) 10

1.5.2 Schwefelwasserstoff als Therapieansatz 10

1.6 Bedeutung der Zytokine und Chemokine **12**

1.7 Zielsetzung der Arbeit **16**

2 MATERIAL UND METHODEN **17**

2.1 Tierversuche **17**

2.2 Induktion eines Thoraxtraumas **17**

2.3 Behandlung mit Schwefelwasserstoff (H_2S) **18**

2.4 Probenmaterial **19**

2.4.1 Töten der Versuchstiere durch Ausbluten 19

2.4.2 Gewinnung der bronchoalveolären Lavage (BAL) und Isolation der Alveolarmakrophagen (AMΦ) 20

2.4.3 Isolation von Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) 21

2.4.4 Isolation von neutrophilen Granulozyten (PMN) 24

2.5 Aufreinigung der Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) oder Alveolarmakrophagen (AMΦ) durch Selektion der neutrophilen Granulozyten (PMN) **25**

2.6 Stimulation der Alveolarmakrophagen (AMΦ) und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) durch löslichen Fas-Ligand (sFasL) **26**

2.7 Apoptose-Nachweis durch Annexin V–Immunfluoreszenzfärbung **28**

2.8 Durchflusszytometrische Analyse (FACS) von Fas und Fas-Ligand auf Alveolarmakrophagen (AMΦ) und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) **29**

2.9 RNA-Isolation **30**

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) **30**

2.11 Anfärben der Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) und der neutrophilen Granulozyten (PMN) mit anschließender Apoptose-Induktion durch ultraviolette Strahlung **32**

2.12 Opsonierung der Latexpartikel **34**

2.13 In vitro-Phagozytose-Assay **35**

2.14 In vivo-Phagozytose-Assay **36**

2.15 Bestimmung der Chemokinkonzentrationen im Kulturüberstand und in der bronchoalveolären Lavage **37**

2.16 Proteinanalysen **37**

2.16.1 Bestimmung der Proteinkonzentration 37

2.16.2 Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel 38

2.16.3 Semi-Dry-Western Blot 39

2.17 Bestimmung des löslicher Fas-Ligand (ELISA) **41**

2.18 Statistik **43**

3 ERGEBNISSE **44**

3.1 Nachweis von Fas/FasL nach stumpfem Thoraxtrauma **44**

3.1.1 Nachweis von löslichem Fas-Ligand (sFasL) in Alveolarmakrophagen (AMΦ)-Kulturüberständen .. 44

3.1.2 Apoptose-Induktion durch löslichen Fas-Ligand (sFasL) in Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) bzw. Alveolarmakrophagen (AMΦ) 45

3.1.3 Mediatorenfreisetzung in Alveolarmakrophagen (AMΦ)- oder Alveolar-Typ 2 Epithelzell (AT2-Zell) -Kulturen mit und ohne Stimulation durch löslichen Fas-Ligand (sFasL) 47

3.1.4 Durchflusszytometrische Bestimmung von Fas- und FasL-Protein auf Alveolarmakrophagen (AMΦ)- und Alveolar-Typ 2 Epithelzell (AT2–Zell) -Oberfläche 49

3.1.5 Expression von Fas und FasL-mRNA in Alveolarmakrophagen (AMΦ) und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) 50

3.2 Phagozytose- bzw. Efferozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen (AMΦ) **53**

3.2.1 Zahl der neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage (BAL) nach Thoraxtrauma 53

3.2.2 Apoptose-Induktion in neutrophilen Granulozyten (PMN) und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) 54

3.2.3 *In vitro*-Phagozytose- bzw. Efferozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen (AMΦ) nach Thoraxtrauma 55

3.2.4 Mediatorenfreisetzung durch Alveolarmakrophagen (AMΦ) während der Phagozytose bzw. Efferozytose 59

3.2.5 Freisetzung von löslichem Fas-Ligand (sFasL) durch Alveolarmakrophagen (AMΦ) während der Phagozytose bzw. Efferozytose 64

3.2.6 Surfactant-Proteine (SP) in der bronchoalveolären Lavage (BAL) 65

3.2.7 Fractalkine-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) 66

3.2.8 *In vivo*-Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen (AMΦ) nach intratrachealer Instillation von opsonierten Latexpartikeln 67

3.2.9 Surfactant-Protein D - mRNA-Expression in Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) 68

3.2.10 Zytokin-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage nach intratrachealer Instillation von opsonierten Latexpartikeln 69

3.2.11 *In vitro*-Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen nach Behandlung mit Schwefelwasserstoff (H_2S) 73

4 DISKUSSION 74

4.1 Die Rolle der Fas/FasL-Expression von Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) und Alveolarmakrophagen (AMΦ) nach Thoraxtrauma 75

4.2 Die Bedeutung von löslichem Fas-Ligand für das posttraumatische inflammatorische Geschehen in der Lunge 77

4.3 Phagozytose bzw. Efferozytose-Aktivität der Alveolarmakrophagen nach Thoraxtrauma 80

4.4 Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen in vivo 82

4.5 Auswirkungen der Phagozytose bzw. Efferozytose auf die Zytokin-Sekretion der Alveolarmakrophagen nach Thoraxtrauma 84

4.6 Auswirkungen der posttraumatischen Schwefelwasserstoff-Inhalation auf die Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen 87

5 ZUSAMMENFASSUNG 89

6 LITERATURVERZEICHNIS 91

LEBENSLAUF 109

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ADAM10	A disintegrin and metalloproteinase domain containing protein 10
AIF	Apoptosis inducing factor
ALI	Acute lung injury
AMΦ	Alveolarmakrophagen
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of variance)
Apaf-1	Apoptosis protease- activated factor-1
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AT1-Zelle	Alveolar-Typ 1 Epithelzellen, Pneumozyt Typ 1
AT2-Zelle	Alveolar-Typ 2 Epithelzellen; Pneumozyt Typ 2
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Bax	Bcl-2 associated x-Protein
Bcl-2	B-cell lypmphoma 2
BH3	Bcl-2 homology-domain 3
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
β2-GPI	β2-Glycoprotein I
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CAD	Caspase activated DNAse
CBS	Cystathionin-β-Synthase
DD	Death domain
DED	Death effector domain
CD95	Cluster of differentiation 95 (Fas; Fas-Rezeptor; APO-1)
CSE	Cystathionin-γ-Lyase
CCL2	Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)
CCL3	Macrophage inflammatory protein-1α (MIP−1α)

CCL5	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted (RANTES)
CCR1, 2, 3, 5	Rezeptoren der entsprechenden CCL-Zytokine
cFLIP	cellular FLICE inhibitor protein
CINC-1	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 / CXCL1
CO_2	Kohlendioxid
CXCL1	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1)
CX3CL1	Fractalkine
CR-1, -4	Komplement-Rezeptor-1, -4
CR-3	Komplement-Rezeptor-3 (Mac-1; CD11b/CD18)
CRT	Calreticulin
Cyt c	Cytochrom c
DAG	Diacylglycerin
d	Tag
ddH_2O	Bidestilliertes Wasser
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco`s phosphate-buffered saline
et al.	et alterae; und andere
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Fas	Fas-Rezeptor/CD95/APO-1
FasL	Fas-Ligand
FADD	Fas associated protein with death domain
Fc	kristallisierbares Fragment
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	Procaspase 8
FLIP	FLICE inhibitor protein
Gas6	Growth arrest-specific 6

GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
G-CSF	Granulozyten Kolonie-Stimulierender Faktor
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff/Salzsäure
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H_2S	Schwefelwasserstoff
HRP	Horseradish peroxidase/Meerrettichperoxidase
ICAD	Inhibitor of caspase activated DNAse (DDFA)
ICAM	Intercellular adhesion molecules
IDT	Densitometrisch ermittelte Intensität
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL-1β	Interleukin-1 beta
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IP3R	Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptor
ISS	Injury severity score
ITAM	Immunrezeptor-tyrosinbasiertes Aktivierungsmotiv
JAK/STAT-Weg	Signalweg über Januskinasen (JAK) und Transkriptionsfaktoren mit SH2-Domänen (STAT/ signal transducers and activators of transcription)
JAK2	Janus Kinase 2
kDa	Kilodalton
KC	Keratinocyte-derived cytokine
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPS	Lipopolysaccharid
MAP-Kinase	Mitogen-activated Protein-Kinase
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1 / CCL2
MFG-E8	Milk Fat Globule-EG Factor 8 (Lactadherin)
min	Minute
MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha / CCL3
mM	millimolar
MOV	Multiorganversagen

mRNA	Messenger-RNA (Ribonukleinsäure)
NaCl	Natriumchlorid/Kochsalz
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Nm	Nanometer
NTP	Nukleotide
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
pg	Pikogramm
pH	Potentia Hydrogenii
PKC	Proteinkinase C
PMN	Polymorphnukleäre Leukozyten / Neutrophile Granulozyten
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Azetat
PSR	Phosphatidylserin-Rezeptor
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted/CCL5
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat / Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sFasL	Löslicher Fas-Ligand
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
SP-A, -B, -C, -D	Surfactant-Protein-A, -B, -C, -D
TACE	Tumornekrosefaktor-α converting Enzym
TBST=TTBS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N,N,-Tetramethyl-ethylendiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNF-RI und -RII	Tumornekrosefaktor-Rezeptoren I (p55) und II (p75)
THP-1	Humane Acute Monocytic Leukemia Cell Line
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSP-1	Thrombospondin-1
U	Einheit (unit)
vs.	versus
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

× g	-fache Erdbeschleunigung
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des stumpfen Thoraxtraumas

Der Verkehrunfall steht in den industrialisierten Ländern an oberster Stelle der häufigsten Todesursachen bei der Gruppe der bis 45-Jährigen [97]. Dabei ist das Polytrauma als lebensbedrohliche Mehrfachverletzung häufig die Ursache für den letztlich letalen Ausgang. In 78-82% aller Polytrauma-Fälle kommt es zu eine Mitbeteiligung der Brustkorb in Form eines Thoraxtraumas [97,198]. Daher stellt das meist stumpfe Thoraxtrauma einen hochrelevanten Bestandteil des Polytraumas dar [13,141], dessen Beteiligung im Verletzungsmuster die Mortalitätsrate signifikant ansteigen lässt [58]. Bei Polytrauma-Patienten mit einer durchschnittlichen Mortalitätsrate von 27 % führt die Beteiligung der Lunge in Form eines Pneumothorax, Hämothorax oder eines instabilem Thorax mit Rippenserienfraktur und Lungenkontusion zu Mortalitätsraten zwischen 38 % und 68 % [58]. Auch Trupka et al. machten bereits 1998 deutlich, dass die Letalität von Polytrauma-Patienten durch ein Thoraxtrauma von 7 % auf 18 % steigt [198]. Ebenso steigt die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines respiratorischen Versagens, eines akuten progressiven Lungenversagens (ARDS, Acute respiratory distress syndrome), eines Multiorganversagens (MOV) oder einer Pneumonie signifikant gegenüber Polytrauma-Patienten ohne Thoraxtrauma [198]. Die Ausbildung von Atelektasen und/oder eines Lungen- oder Pleura-Empyems können ebenfalls als Komplikationen nach einem stumpfen Thoraxtrauma auftreten [77]. Die Verschlechterung der Prognose durch eine Lungenbeteiligung im Verletzungsmuster von Polytrauma-Patienten wurde auch von Pape et al. in klinischen Studien an Patienten mit intramedullärer Schienung des Femur belegt [142]. Hier waren die Inzidenz eines posttraumatischen ARDS und die Mortalität nach Marknagelung bei Patienten mit zusätzlichem schwerem Thoraxtrauma signifikant erhöht. Ebenfalls steigt, aufgrund einer eingeschränkten Clearance-Rate gegenüber gram-negativen Bakterien, nach Kontusion des Brustkorbs die Prädisposition für die Entwicklung einer Pneumonie [40].

Die Bedeutung des Thoraxtraumas in Kombination mit anderen Verletzungen zeigt sich auch im, insbesondere bei Polytraumen benutzten, Injury Severity Score (ISS). In diesem Bewertungsmassstab für die Einschätzung der Gesamtverletzungsschwere wird die Schädigung der Lunge als eine von sechs Körperregionen berücksichtigt [11].

1.2 Physiologie des Alveolarraums

Das Grundgerüst der Alveolen wird aus Fibrozyten mit elastischen und retikulären Fasern gebildet. Die flachen Endothelzellen des, die Alveolen umgebenden Kapillarnetzes und die Epithelzellen der Alveolen sind die wichtigsten Zellen für den, in den Alveolen stattfindenden Gasaustausch. Zusammen mit der unterschiedlich stark ausgeprägten Basallamina stellen sie die Blut-Gas-Schranke dar. Das Epithel der Alveolen besteht aus zwei sich in Morphologie und Funktion stark unterscheidenden Zelltypen: über 90 % der Alveolenoberfläche besteht aus den flachen Alveolar-Typ 1 Epithelzellen (AT1-Zellen). Sie dienen dem Gasaustausch. Die geringe Dicke dieser Zellen von durchschnittlich 0,2 µm ermöglicht die leichte Diffusion der Gase über die Blut-Gas-Schranke. Die kuboidalen Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) machen nur ca. 10 % der Alveolenoberfläche aus. Ihre Aufgabe ist die Regeneration des Alveolarepithels durch Differenzierung zu AT1-Zellen [46,3,201]. Eine weitere wichtige Funktion der AT2-Zellen ist die Synthese und Abgabe, aber auch die Wiederaufnahme und der Abbau von Surfactant (surface active agent) [53,14]. Diese oberflächenaktive Substanz aus ca. 90 % Lipiden mit einem hohen Anteil an Phospholipiden und ca. 10 % Surfactant-Proteinen wird bis zur Sekretion in den Alveolarraum in Lamillarkörper im Zytoplasma der AT2-Zellen gespeichert. Surfactant hat zwei herausragende Funktionen im Respirationstrakt. Einerseits wird über die lipophile Komponente die Oberflächenspannung in den Alveolen verringert, somit der Gasaustausch erleichtert und die Alveolen werden bei der Atmung stabilisiert. Andererseits sind die Surfactant-Proteine ein wichtiger Bestandteil für die Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts innerhalb des Bronchoalveolarraums [203]. Von den vier Surfactant-Proteinen Surfactant-Protein (SP)-A, SP-B, SP-C und SP-D spielen SP-A und SP-D als Opsonine bei der Eliminierung von apoptotischen Zellen und eingedrungenen Pathogenen durch Alveolarmakrophagen eine wichtige Rolle (siehe auch 1.5 Phagozytose und Efferozytose) [194,204,205].

1.3 Pathophysiologie des stumpfen Thoraxtraumas

Durch die Kontusion des Brustkorbes kommt es zu histologisch nachweisbaren funktionellen und strukturellen Veränderungen des Lungengewebes. Die Schädigung des Endothels [170] und des Alveolarepithels führen zu Einblutungen in den Alveolarraum und in das Interstitium der Lunge. Das dadurch entstehende interstitielle und/oder perivaskuläre Ödem [138,171] bewirkt eine Verbreiterung der Alveolarsepten [75], was zu Störungen des Sauerstoff- und Kohlendioxidaustausches führt. Die Anreicherung von neutrophilen Granulozyten in den

Alveolen wird von einer anhaltenden Permeabilitätsstörung [72] begleitet. Diese kann durch die steigende Proteinkonzentration in der BAL nachgewiesen werden [116,149]. Durch die massive Einwanderung der aktivierten neutrophilen Granulozyten in die Lunge kann sich eine akute Lungeninsuffizienz (ALI, Acute lung injury) entwickeln [137]. Ebenso wird durch diese Akkumulation der Granulozyten ein starker Anstieg der von ihnen abgegebenen pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL-6, IL-1β, KC und MIP-2 [2,116] in den Alveolen nachweisbar. Trotz steigender Anzahl an neutrophilen Granulozyten wird die Bakterien-clearance in den Alveolen durch die Induktion eines stumpfen Thoraxtraumas eingeschränkt [40].
Ferner kommt es nach der Induktion eines stumpfen Thoraxtraumas zum Rückgang vitaler und funktionstüchtiger AT2-Zellen [178] und durch diese Schädigung des Alveolarepithels zur Minderung der Surfactant-Funktion [137].

1.4 Apoptose

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein ständig im Organismus ablaufender Vorgang, der den Körper vor überalterten, mutierten oder überzähligen Zellen schützt. Im gesunden Körper kommt es täglich zum Zelluntergang von mehr als 10^9 Zellen, von denen kaum apoptotische Zellen histologisch nachweisbar sind [174]. Die Apoptose läuft im Gegensatz zur Nekrose ohne Beeinträchtigung des umgebenden Gewebes ab. So löst der auch „physiologischer Zelluntergang“ genannte Vorgang keine Entzündungsreaktion aus und lässt sich auch morphologisch eindeutig vom pathologischen Zelluntergang, der Nekrose, unterscheiden. Nach Apoptoseinduktion kommt es zum Schrumpfen der Zelle. Das Zytoplasma und das Chromatin kondensieren. Die DNA wird enzymatisch fragmentiert und das in vitalen Zellen an der Innenseite der Zellmembran liegende Phosphatidylserin wird auf die Außenseite umgelagert. Im Gegensatz dazu schwellen nekrotische Zellen an. Beim Zerreißen der Plasmamembran kommt es durch das Austreten von Zytoplasma und Zellorganellen zur Entzündungsreaktion. Die Apoptose als besondere Form des Zelltodes wurde zwar bereits 1842 von Carl Vogt beschrieben [30]. Da die entstehenden apoptotischen Vesikel „still“ durch umgebende Zellen oder Phagozyten aufgenommen werden, wurde ihnen zunächst wenig Bedeutung beigemessen. Erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde die Relevanz dieses Prozesses für den ganzen Organismus erkannt [94].
Die Apoptoseinduktion erfolgt über extra- und intrazelluläre Signale (Abb. 1). Bei der Induktion des intrinsischen Signalwegs kommt es durch unterschiedlichste Reize, wie UV-

Strahlung, Nährstoffmangel oder chemische Reize zu Zellstress bzw. Zellschädigung. Dabei werden einzelne oder mehrere BH3 (Bcl-2 Homologie-Domäne 3)-only Proteine aktiviert, aus dem Endoplasmatischen Reticulum freigesetztes Ca^{2+} in die Mitochondrienmembran aufgenommen und pro-apoptotischen Faktoren wie Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt [55,134,153,173]. Über die Bildung des Apoptosoms wird Caspase 9 aktiviert. Schließlich kommt es über die aktivierte Effektor-Caspase 3 zur Abspaltung der Caspase–activated DNAse (CAD) von ICAD (Inhibitor of caspase–activated DNAse =DDFA) [43]. Dies führt zu deren Oligomerisierung und zur inter-nukleosomalen Spaltung der DNA [69,70]. Andere Mechanismen, wie z.B. die Proteolyse von Rho-Effektor ROCK1 führen über die Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts zur Ausbildung der typischen morphologischen Kennzeichen einer apoptotischen Zelle mit kondensiertem Zellkern und Zellmembranausstülpungen, dem sogenannten *blebbing*.

Die extrinsische Signalkaskade wird ausgelöst durch die Bindung der Liganden an die sogenannten Todesrezeptoren, wie z.B. Fas (CD95), auf der Oberfläche der Zellen und bewirkt eine Trimerisierung des Rezeptors. Dadurch wird die Bildung des Death-Inducing Signaling Complex (DISC) induziert. Dieser entsteht an der Todesdomäne (death domain, DD) des intrazellulären Teils des Rezeptors durch Interaktion mit spezifischen Adaptorproteinen. Die Anlagerung von FADD (Fas-associated death domain), einer weiteren Todesdomäne mit anhängender Todeseffektordomäne (DED), an DD, und die Anlagerung von Procaspase 8 (FLICE) an deren DED, führt zu deren Aktivierung zu aktiven Initiator-Caspase 8. Die durch diese Caspase 8 aktivierte Effektor-Caspase 3 kann über den oben aufgeführten Signalweg die DNA-Spaltung im Zellkern hervorrufen. Intrinsische und extrinsische Signalwege führen über die Effektor-Caspasen zu den gemeinsamen terminalen Wirkungen. Sie sind auch in unterschiedlichen Ebenen der Signalkaskade miteinander verknüpft. Unter anderem transloziert der C-terminale Teil von tBid (truncated BH3-interacting domain death agonist), ebenfalls einem BH3-only-Protein, nach proteolytischer Aktivierung durch Caspase 8 zum Mitochondrium und triggert hier die Freisetzung apoptotischer Faktoren. Die Induktion der Apoptose wird durch eine Vielzahl an anti-apoptotische Regulationssignale der Zelle kontrolliert. Während der Proliferation der Zelle wird durch eine hohe Konzentrationen von cFLIP (cellular FLICE inhibitor protein), dem Procaspase 8-Antagonisten, die Bildung des DISC durch Verdrängung von Procaspase 8 verhindert. Somit wird die Aktivierung von Procaspase 8 zu Caspase 8 und damit die Apoptose blockiert [156]. ARC (Apoptosis Repressor with Caspase recruitment domain) hemmt die Caspasen-Kaskade ebenfalls auf Höhe der Caspase 8 [102]. Ein weiterer Inhibitor

ist XIAP (X-linked Inhibitor of apoptosis-Proteine). Dieser hemmt sowohl Caspase 3, als auch Caspase 9 [161,185].

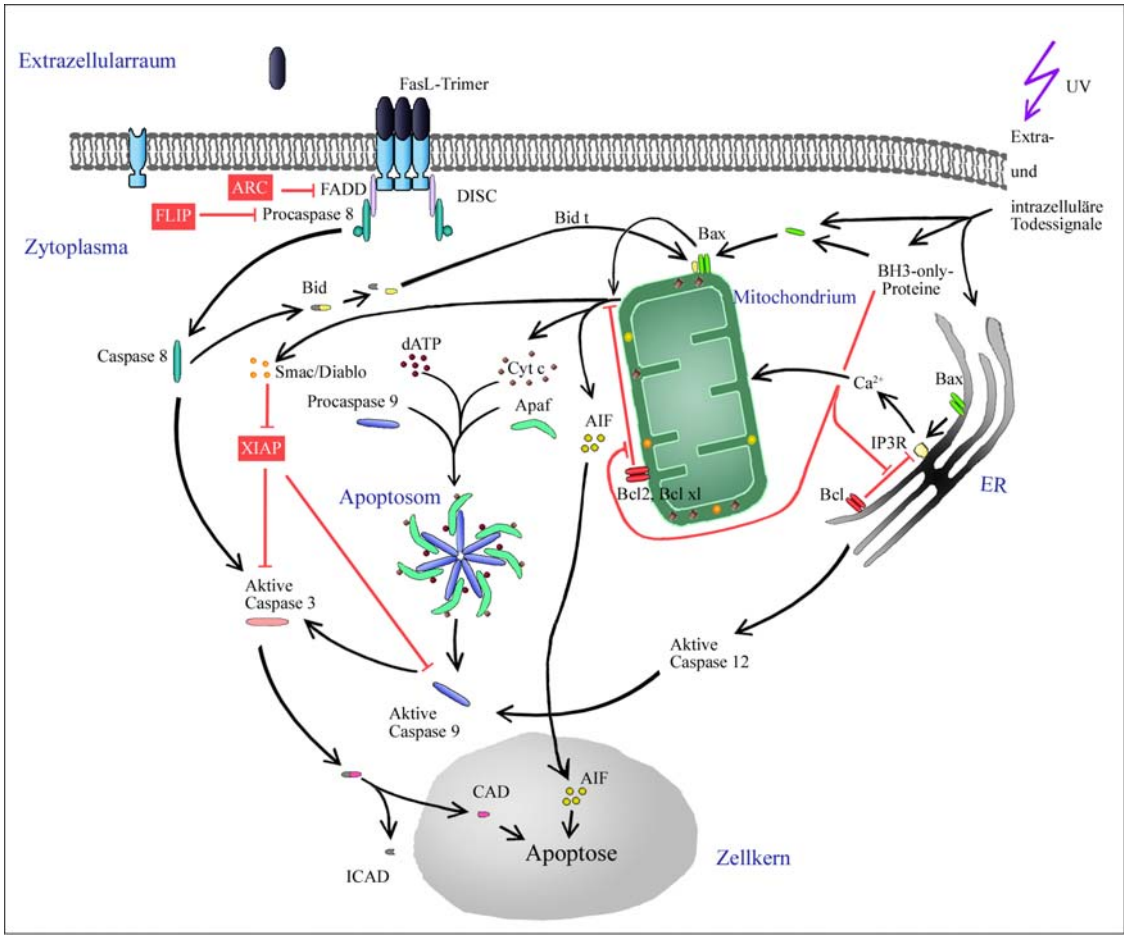

Abb.1 : Apoptose-Signalwege
Der extrinsische Weg der Apoptoseinduktion erfolgt über die Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche durch die Anlagerung von Liganden. Die durch die Bindung von Fas-Ligand (FasL) an Fas (CD95) induzierte Trimerisierung von Fas ermöglicht die Anlagerung des Fas-assoziierten Proteins mit Todesdomäne (FADD) an die intrazelluläre Todesdomäne (DD) von Fas. Durch die Bindung der Todeseffektordomäne von Procaspase 8 an die Todeseffektordomäne von FADD kommt es zur autokatalytischen Aktivierung von Procaspase 8 zur Initiator-Caspase 8, die ihrerseits Caspase 3 aktiviert. Über diese am Ende verschiedenster Aktivierungswege stehende Effektor-Caspase kommt es zur Spaltung des DNA-fragmentation factor (DDF) (Enari 1998). Die Oligomerisation des Spaltprodukts CAD führt zur DNA- und Zellkern-Fragmentation, den charakteristischen Kennzeichen einer apoptotischen Zelle (Hanus 2008). Im Zentrum der Apoptoseinduktion des intrinsischen Weges stehen die Mitochondrien. Extra- und intrazellulärer Stress führt hierbei z.B. über die BH3 (Bcl 2-homology-Domaine 3)-only-Proteine zur Aktivierung des zur Bcl-2-Familie gehörenden pro-apoptotischen Proteins Bax. Dies bewirkt die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren, wie z.B. Cytochrom c (Cyt c), Second mitochondrial derived activator of caspase (Smac/Diablo) und Apoptosis inducing factor (AIF) aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma. Die Bindung von Cytochrom c und dATP an den apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) führt hier zur Konformationsänderung der Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) am entstehenden Apoptosom und ermöglicht damit die Anlagerung der Procaspase 9. Die Zusammenlagerung zum Heterodimer im Apoptosom führt zur Aktivierung der Procaspase 9 zur aktiven Caspase 9, die wiederum die Effektor-Caspase 3 aktiviert. Auch das endoplasmatische Retikulum (ER) ist über die BH3-Proteine in den intrinsischen Weg eingebunden. Durch von Bax und Bcl kontrollierte Interaktionen mit dem Inositol 1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor (IP3R) kommt es zur Abgabe von Ca^{2+} ins Zytoplasma (Nutt LK 2002; Scorrano L 2003). Der Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration im Mitochondrium geht mit der vermehrten Abgabe oben genannter pro-apoptotischer Faktoren einher. Auch andere Signalwege werden über extra- und intrazelluläre Todessignale aktiviert.
Abbildung modifiziert nach Foo RSY 2005 und Portt L 2011

1.5 Phagozytose und Efferozytose

Die Entfernung von in den Körper eingedrungenen Mikroorganismen, Partikeln und apoptotischen Zellen erfolgt über deren Ingestion durch professionelle Phagozyten wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen. Apoptotische Zellen werden zusätzlich durch benachbarte Zellen wie Epithelzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten eliminiert. Die Erkennung dieser unterschiedlichen zu entfernenden Partikel erfolgt über verschiedene Rezeptoren der phagozytierenden Zellen.

Die zur unspezifischen Immunabwehr gehörende Aufnahme von Mikroorganismen in die Phagozyten erfolgt sowohl nach der Opsonierung der Antigen-Oberflächen mit Antikörpern, als auch über die unspezifische Opsonierung mit Komplement. Der Fab-Teil (antigen-binding fragment) des nach Antigen-Kontakt gebildeten Antikörpers bindet spezifisch an die als körperfremd erkannten Strukturen, während der freie Fc-Teil (Kristallisierbares Fragment) der Erkennung durch den Fcγ-Rezeptor (FcγR) auf Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten dient. Mit der Bindung an einen der aktivierenden Fcγ-Rezeptoren wird die Phagozytose des Antigen-Antikörperkomplexes stimuliert [158]. Die Bindung an FcγRI, FcγRIIIa und FcγRIVa induziert über ihre intrazellulären, mit ITAM assoziierten Strukturen, die Aufnahme und Zerstörung des antikörpergebundenen Antigens [157]. Die Phagozytose von Komplement opsoniertem Material über die Komplement-Rezeptoren (CRs) erfolgt schrittweise durch aktivierte Makrophagen [183]. Die konstitutiv im Serum vorliegenden C3bi-Komplementproteine opsonieren unspezifisch körperfremdes Material. Nach der Opsonierung kommt es zur Bindung an die Komplement-Rezeptoren CR-3 (Mac-1, CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$) oder CR-1. Nach zusätzlicher Stimulation, z.B. durch Phorbolester (PMA) oder Lipopolysaccharid (LPS) folgt dann erst die Ingestion [64,162]. Der Komplement-Rezeptor CR-3 liegt konstitutiv auf den Oberflächen neutrophiler Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen vor [21]. Durch die zusätzliche Stimulation mit PMA kommt es auf der Oberfläche von Maus-Makrophagen und humanen MDM (Monocyte-derived macrophages) zur Ausbildung von Fältchen, in denen der CR-3 vermehrt ausgebildet wird [145]. PMA fördert in humanen Monozyten die Induktion der Phagozytose über CR-1 und CR-3, hat aber keine phagozytosefördernde Wirkung auf die Fcγ-Rezeptoren [218].

Das Collectin Surfactant- Protein- A (SP-A), Bestandteil des Surfactants der Lunge, besitzt eine verstärkende Wirkung auf die Phagozytose von opsonierten Mikroorganismen durch Alveolarmakrophagen [194,204]. Phagozytosefördernd wirkt auch die durch SP-A ausgelöste erhöhte Expression von CR-3 auf Alveolarmakrophagen [62]. Die Bindung von SP-A an

CR-3 der Alveolarmakrophagen-Oberfläche erhöht dadurch Ca^{2+}-abhängig die CR-3-vermittelte Phagozytose von Bakterien.

Die Phagozytose von apoptotischen Zellen weist einige Ähnlichkeiten mit der Phagozytose von Mikroorganismen oder anderen körperfremden Partikeln auf. So spielen bei beiden Ingestionsvorgängen ähnliche Erkennungsmuster eine Rolle. Sowohl die Opsonierung durch Komplement [124,192], als auch die Opsonierung mit SP-A und SP-D oder die Interaktion über das Mannose-Binding-Lektin (MBL) [205] fördern ebenfalls die Ingestion von apoptotischen Zellen.

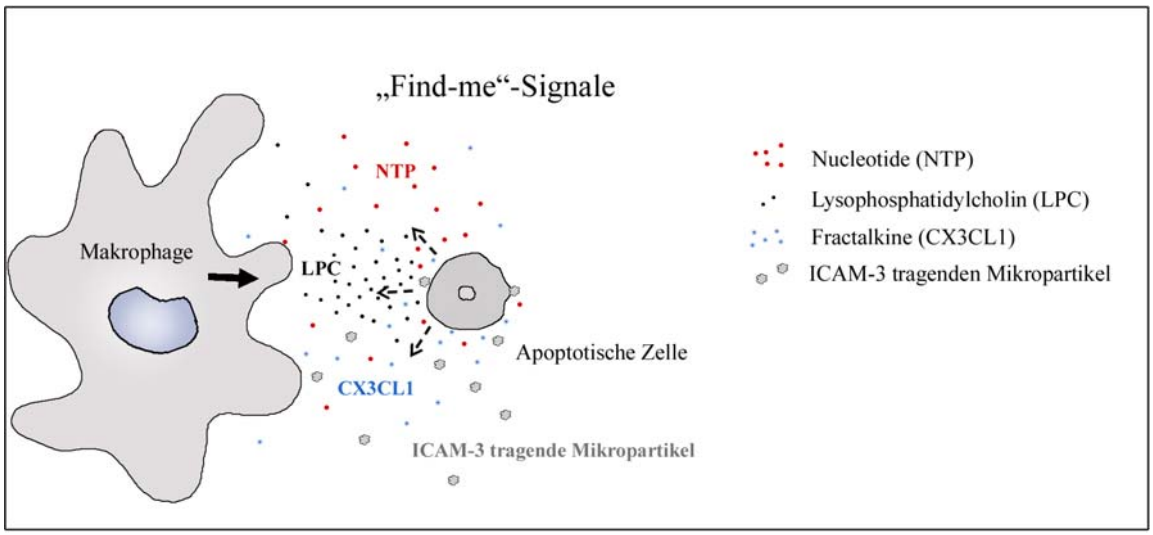

Abb. 2: Efferozytose „Find-me"-Signale
Apoptotische Zellen können durch die Abgabe von Find-me-Signalen, wie den Nucleosidtriphosphaten ATP und UTP (Elliott 2009), Lysophosphatidylcholin (LPC) (Lauber 2003, Peter C 2007), Fractalkine (CX3CL1) (Truman 2008) und an Mikropartikel gebundenem Intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) (Torr 2012) von Makrophagen lokalisiert werden. Diese chemotaktischen Mediatoren führen zur Migration der Makrophagen zu apoptotischen Zellen.

Bei der Erkennung apoptotischer Zellen spielen jedoch auch andere Rezeptoren eine Rolle. Dies und die Tatsache, dass die Phagozytose von apoptotischen Zellen eher anti-inflammatorische, als pro-inflammatorische Reaktionen hervorruft, lassen es sinnvoll erscheinen, zur Abgrenzung von der Phagozytose von Mikroorganismen oder Fremdpartikel den von deCathelineau und Henson (2003) und Gardai (2005) etablierten Begriff der Efferozytose (*effero* latein: zu Grabe tragen) für den Vorgang der Ingestion von apoptotischen Zellen zu verwenden [35,60].

Die Efferozytose lässt sich in drei Schritte unterteilen: Um als apoptotische Zelle erkannt und gefunden zu werden, geben apoptotische Zellen in der Frühphase der Apoptose sogenannte „Find-me"-Signale ab. Zu diesen chemotaktisch aktiven Signalen gehören Nukleotide (ATP/UTP) [42], Lysophosphatidylcholin (LPC) [108,151], das Chemokin Fractalkine (CX_3CL1) [197] und auf Mikropartikeln lokalisiertes ICAM (Intrazelluläres Adhäsionsmolekül) -3 [196] (Abb. 2). Nach der Rekrutierung der

professionellen Phagozyten erfolgt die Bindung der apoptotischen Zelle. Somersan and Bhardwaj fassten diesen Vorgang als sogenanntes „Tethering und Tickling“-Modell zusammen [187]. Unterschiedliche „Eat-me“-Signale ermöglichen ein erstes Binden (Tethering) der apoptotischen Zelle. Anschließend kommt es über die Interaktion von Phosphatidylserin mit den Phosphatidylserinrezeptoren zur Aktivierung (Tickling) der darauf folgenden Internalisierung der apoptotischen Zelle.

Die Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran apoptotischer Zellen gilt als wichtigstes „Eat-me“-Signal [49]. Es wird über verschiedene Rezeptoren mit unterschiedlichen „Brückenmolekülen“ auf den phagozytierenden Zellen erkannt. Zu den Rezeptoren gehören u.a. der Phosphatidylserin-Rezeptor [48], der β2-GPI-Rezeptor (β2-Glycoprotein I) [12], die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Mer [86,174], der Vitronectin-Rezeptor [67,68], das an den Vitronectin-Rezeptor angelagerte CD36 [166] und Stabilin 2 [144] (Abb. 3). Unter den Brückenmolekülen vermittelt z.B. das β2-Glycoprotein I die Bindung an den β2-GPI-Rezeptor und Growth-arrest-specific 6 (Gas6) die Bindung an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Mer. Annexine assoziieren an Phosphatidylserin und erfüllen somit ebenfalls eine Opsonin-ähnliche Funktion [10,163]. Der an oxidiertes Phosphatidylserin bindende Milk-Fat-Globule-Epidermal-Growth-Faktor 8 (MFG-E8) kann durch Ligation an den Vitronectin-Rezeptor ($\alpha_v\beta_3$-Integrin) die Efferozytose-Aktivität dendritischer Zellen erhöhen [6,20]. Auch Protein S fördert in oligomerisierter und oxidierter Form die Aufnahme apoptotischer Zellen über die humane Rezeptor-Tyrosin–Kinase [9,200]. Weitere Brückenmoleküle sind das adhäsive Protein Thrombospondin [166] und das vermehrt auf apoptotischen Zellen anlagernde Calreticulin [60] (Abb. 3). Die Collectine SP-A, SP-D, MBL und die Complement-Proteine C1q und C3bi, sowie MFG-E8 erleichtern das Anlagern an und teilweise auch die Aufnahme der apoptotischen Zellen in die Phagozyten [159,167,205,67,68,126,125]. Dabei kommt es zur Anlagerung an Zucker-Reste auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen und zur Interaktion mit dem Calreticulin-CD91-Komplex [205] der phagozytierenden Zelle. Die Calreticulin-Expression, sowie die ICAM-1-Expression auf der Oberfläche apoptotischer Zellen gelten ebenfalls als efferozytosefördernde Marker [60,128].

Diese je nach Zelltyp unterschiedlich stark exprimierten Rezeptoren und je nach Organsystem unterschiedlich stark auftretenden Brückenmoleküle bilden die Voraussetzung für die Interaktion des ingestierenden Phagozyten mit der apoptotischen Zelle und deren sich anschließenden Aufnahme.

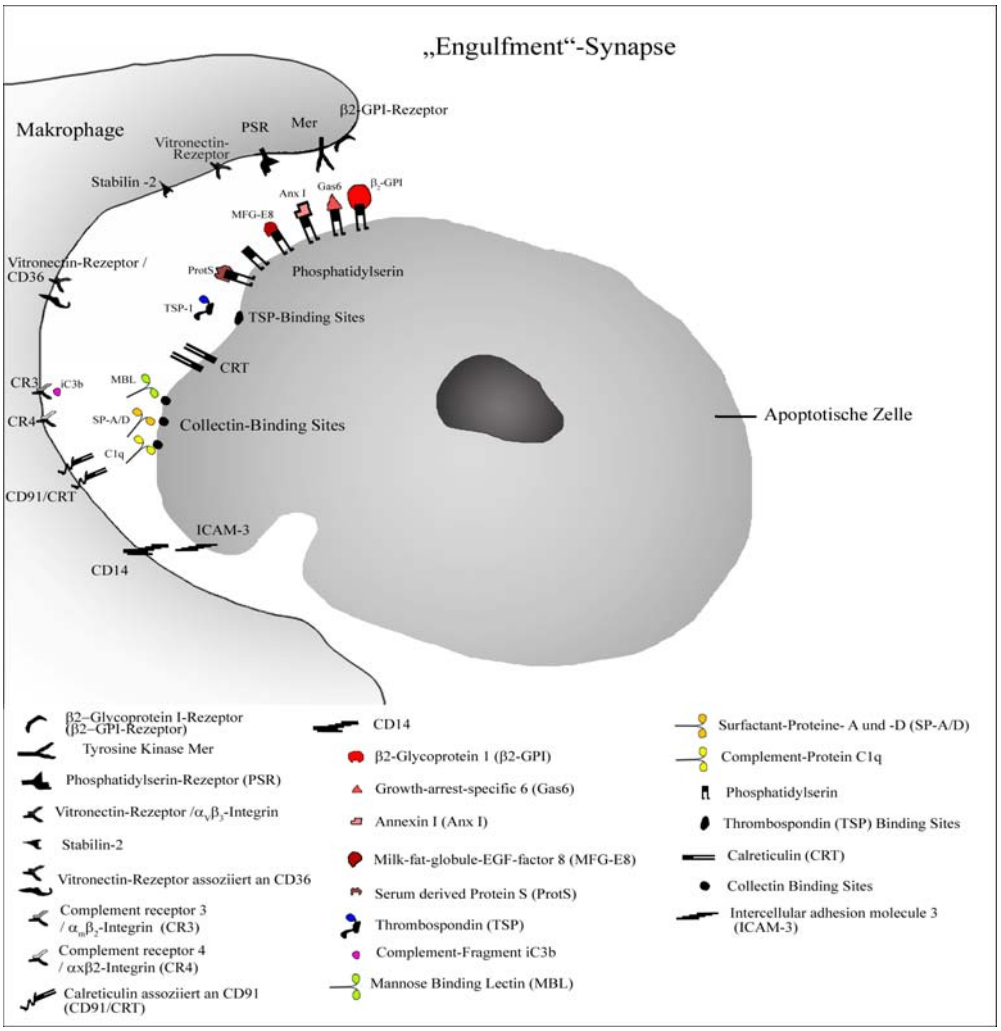

Abb. 3: Efferozytose „Engulfment-Synapse"
Nach der Rekrutierung der Makrophagen erfolgt die Bindung der apoptotischen Zelle. Unterschiedliche Strukturveränderungen auf der apoptotischen Zelloberfläche wirken teilweise über sogenannte Brückenmoleküle als „Eat-me"-Signale auf die Makrophagen. Das von der Innenseite der Zellmembran durch die Apoptose auf die Außenseite translozierte Phosphatidylserin wird von unterschiedlichen Molekülen erkannt und markiert. Mit dem Phosphatidylserin-Rezeptor (PSR) kommt es zu einer direkten Bindung (Fadok 2002). Über das Brückenmolekül β2-GPI kommt es zu Interaktion mit dem β2-GPI-Rezeptor (Balasubramanian 1997). Gas6 und oxidiertes, oligomerisiertes Protein S wirken als Vermittler zwischen Phosphatidylserin und der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Mer (Ishimoto 2000; Scott 2001, Uehara H 2008). Das bei der Apoptose von der apoptotischen Zelle abgegebene Annexin I wirkt wie oligomerisiertes Protein S durch die Bindung an Phosphatidylserin auf einen Phosphatidylserin-Rezeptor efferozytosefördernd (Arur 2003; Anderson 2003, Uehara H 2008). Der Milk fat globule EGF-factor 8 (MFG-E8), der an Phosphatidylserin bindet, interagiert mit der Vitronectin-Rezeptor (Hanayama 2002). Die Anlagerung des adhäsiven Proteins Thrombospondin vermittelt durch Anlagerung an CD36 und an den Vitronectin-Rezeptor die Bindung zwischen apoptotischer Zelle und Makrophage (Savill 1992). Auch das vermehrte Auftreten von Calreticulin auf apoptotischen Zellen initiiert eine erhöhte Eliminationsrate apoptotischer Zellen (Gardai 2005). Die Collectine SP-A, SP-D, MBL und C1q binden an die veränderten Zuckerreste auf der Oberfläche der apoptotischen Zelle und am CD91-assoziierten Calreticulin der Makrophagen (Vandivier 2002). Das durch Phosphatidylserin aktivierte Komplement-System hat zusätzlich über das Komplement-Fragment C3bi, das an die Zelloberfläche der apoptotischen Zelle adhäriert und an die Komplement-Rezeptoren CR-3 und CR-4 bindet, eine steigernde Wirkung auf die Efferozytose (Mevorach 1998). Die ICAM-3-Expression auf apoptotischen PMN führt über CD14 ebenfalls zur Bindung an Makrophagen (Moffatt 1999).

1.5.1 Zellaktivierung durch Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA)

Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA, TPA (10-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat)) gehört zu den Phorbolestern, gilt als karzinogen, aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und wirkt über diese auf die Signaltransduktion und die Proliferation der Zelle ein. Durch die Ähnlichkeit mit dem natürlichen Aktivator von PKC, Diacylglycerin (DAG), kann PMA nach Interkalieren in der Zellmembran PKC analog zu DAG aktivieren [25,133]. PKC ist eine Serin/Threonin-Kinase und phosphoryliert die Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin und Threonin verschiedener Proteine. Die drei charakterisierten PKC-Isoformen können unterschiedlich aktiviert werden. Die klassischen cPKCs werden durch die Bindung an die Sekundärsignale Ca^{2+} und DAG aktiviert. Die neuen nPKCs werden nur durch DAG aktiviert. Die atypischen aPKCs sind weder Ca^{2+}- noch DAG-abhängig und können somit auch nicht durch Phorbolester aktiviert werden [140]. Bei allen ist jedoch die Bindung der zu aktivierenden PKC an die Phospholipide der Innenseite der Zellmembran für die Aktivierung unabdingbar.
Verschiedene Modelle nutzen PMA zur Generierung von Makrophagen aus ihren Vorläuferzellen, den Monozyten. Die Zellen der Monozyten-Zelllinie THP-1 werden z.B. mit PMA zu Zellen mit den allgemeinen Charakteristika von Makrophagen genutzt [100]. Ebenso kann in Monozyten des Blutes (PBMC = peripheral blood mononuclear cells) die Differenzierung zu Makrophagen initiiert werden [33]. Typische Merkmale dieser Reifung der Monozyten sind eine Verstärkung des Respiratory Burst, der Phagozytoseaktivität und der Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix.
Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde PMA eingesetzt, um die AMΦ und die in die Lunge eingewanderten Monozyten zu aktivieren und zur Differenzierung leicht anzuregen. Somit konnte der Einfluss einer zusätzlichen PKC-Stimulation auf die Phagozytoseaktivität und auf die Immunreaktion der monozytären Zellen aus dem Alveolarraum der traumatisierten und nichttraumatisierten Lunge untersucht werden.

1.5.2 Schwefelwasserstoff als Therapieansatz

Schwefelwasserstoff (H_2S) ist ein farbloses, brennbares, wasserlösliches, toxisches Gas, mit typischem unangenehmem Geruch (nach faulen Eiern). Die Toxizität von H_2S ist abhängig von der Konzentration und der Einwirkungsdauer des Gases. Es wird auch physiologisch im menschlichen Körper synthetisiert [117,189] und wirkt dabei u.a. vasodilatorisch und neuromodulatorisch [1,212]. Dabei führt der endogene Abbau von L-Cystein durch die

Enzyme Cystathionin-β-Synthase (CBS) und Cystathionin-γ-Lyase (CSE) zur Bildung von H_2S [93,96,117].

Therapeutische Ansätze ergeben sich durch die Möglichkeit, mit der Inhalation von H_2S in nicht-toxischen Konzentrationen einen suspended-animation-ähnlichen Zustand hervorzurufen [18]. Unter diesem Zustand der „vorübergehenden Einstellung des Lebens“ kommt es zur Reduktion der Stoffwechselrate. Dabei bewirken die Senkung der Herz- und Atemfrequenz, sowie die durch den herabgesetzten Metabolismus reduzierte Wärmeproduktion ein Absinken der Körpertemperatur [18]. Dieser durch H_2S hervorgerufene Zustand bewirkt eine höhere Belastbarkeit des Organismus [164]. So kommt es im Tierversuch an der Maus zur Aufhebung der andernfalls letalen Wirkung einer Hypoxie [19]. Eine zellprotektive und anti-inflammatorische Wirkung von H_2S auf Makrophagen konnte von Oh et al. nachgewiesen werden [139]. Auch die extravasale Migration der Leukozyten wird durch H_2S beeinflusst. So hemmt H_2S die Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen [223] und führt dadurch zu einer Reduktion der durch Leukozyten hervorgerufenen Entzündungsreaktion. Durch die verminderte Permeabilität der Gefäßwände durch H_2S kommt es außerdem zu geringer ausgeprägten Ödemen [223]. Esechie et al. konnte nachweisen, dass die parenterale Gabe von H_2S nach einer ALI zu einem signifikanten Anstieg der Überlebensrate führt [45]. Damit einher gehen eine Reduktion des IL-1β-Spiegels in der Lunge, ein Anstieg der IL-10-Konzentration und eine histologisch nachweisbar weniger gestörte Struktur des Lungengewebes [45].

Die Studie zur Untersuchung der Phagozytoseaktivität nach der Behandlung mit Schwefelwasserstoff wurde mit dem von Alexander Veltkamp etablierten H_2S-Expositionsmodell durchgeführt. Im Rahmen seiner Doktorarbeit „Auswirkung von inhalativ verabreichtem H_2S auf die Entzündungsantwort nach einem stumpfen Thoraxtrauma“ konnte durch die 6-stündigen H_2S-Exposition direkt nach Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung eine Reduktion der Körpertemperatur und der körperlichen Aktivität aller eingesetzten CD-Ratten nachgewiesen werden [176].

1.6 Bedeutung der Zytokine und Chemokine

Folgende Zytokinen sind aufgrund ihrer pro- und/oder anti-inflammatorischen, chemotaktischen oder phagozytosemodifizierenden Wirkungsspektren für die Pathomechanismen der Lunge nach einem stumpfen Thoraxtrauma relevant:

Der **Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF-α)** spielt als wichtiges Zytokin der Signalvermittlung durch sein breites Wirkungsspektrum eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung und Ausweitung eines entzündlichen Geschehens bei lokalen und systemischen Erkrankungen. TNF-α existiert in der membrangebundenen Form (26 kDa) [4], dem sogenannten Pro-TNF-α, und der löslichen Form (17 kDa), die durch Abspaltung der membrangebundenen Form durch das TNF-α-converting-Enzym (TACE) entsteht. Nach Stimulation z.B. mit Lipopolysaccharid (LPS) oder Interleukin 1β (IL-1β) wird TNF-α von unterschiedlichen Zellen und in großer Menge von Makrophagen sezerniert. Durch die Bindung von TNF-α an die Rezeptoren TNFR I (= p55 = CD120a) und TNFR II (= p75 = CD120b) können Zellen über den MAP (Mitogen-activated-protein) -Kinase-Signalweg zur Ausschüttung anderer Zytokine, zur Zelldifferenzierung oder zur Apoptose angeregt werden. In der Lunge kommt es über die durch TNF-α hervorgerufene Induktion zu einer erhöhten Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und E-Selektin auf den Endothelzelloberflächen [219] und der Induktion des chemotaktisch wirkenden CINC-1 (Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1) zu einer stärkeren Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten [193,215]. Auf die neutrophilen Granulozyten wirkt TNF-α außerdem aktivierend und führt zu vermehrter Produktion des Superoxidanions O_2^- [179].

Interleukin-1 beta (IL-1β) Als primäre Quelle des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1β gelten Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen. Die Konzentrationen des fiebererzeugenden IL-1β sind selbst in Patienten mit schwerer Sepsis deutlich geringer als die Konzentrationen der Zytokine TNF-α und IL-6 [24], wobei die IL-1β-Konzentrationen mit der Schwere des Krankheitsgeschehens korrelieren [39]. Wie TNF-α induziert auch IL-1β über die entsprechenden Rezeptoren IL-1R Typ I und IL-1R Typ II den MAP-Kinase-Pathway und besitzt somit ein ähnlich breites Wirkungsspektrum wie TNF-α. Endothelzellen der Lunge bilden nach Inkubation mit IL-1β vermehrt die Adhäsionsmoleküle ICAM und E-Selektin an deren Zelloberflächen aus [219]. Dies führt zu einer erhöhten Adhäsion und Einwanderung von Leukozyten an und durch die Gefäßwände. So kommt es nach lokaler

Administration von IL-1β in die Lunge zu einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten mit verstärkter Abgabe von oxygenierten Radikalen, verstärkter chemotaktischer Aktivität und Phagozytoseaktivität [186].

Interleukin-6 (IL-6) gehört, wie TNF-α zu den Akute-Phase-Proteinen und wird über die Aktivierung von NF-κB vermehrt transkribiert. Somit spielt IL-6 in der frühen Phase der Entzündungsreaktion bzw. nach Trauma als vorwiegend pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin eine wichtige Rolle. Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Fibroblasten und T-Zellen können IL-6 sezernieren [217,175,74]. IL-6 aktiviert über die Bindung an den membranständigen IL-6-Rezeptor oder über die Komplexbildung mit der löslichen Form des Rezeptors (sIL-6R) das signalübertragende Protein gp130 [73]. Durch die Bindung von IL-6 an den IL-6-Rezeptor (IL-6R = CD126) (80kDa) und dessen Dimerisierung mit der β-Rezeptor-Untereinheit gp130 (= CD130) [190] kommt es über den JAK/STAT-Pathway zur Transkription unterschiedlicher für die Immunabwehr wichtiger Gene. Die anti-inflammatorische Wirkung von IL-6 beruht auf der Hemmung der Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1β. Nach dem Thoraxtrauma kommt es zu einem schnellen Anstieg der IL-6-Konzentration im Plasma [98]. Auch durch die nach Thoraxtrauma entstehende Hypoxie in der Lunge [99,111] kann es zu einer gesteigerten Expression von IL-6 in den pulmonalen Endothelzellen der versorgenden Gefäße kommen [221].

Interleukin-10 (IL-10) ist ein hochwirksames anti-inflammatorisches Zytokin, das nach LPS-Stimulation die Transkription vieler pro-inflammatorischer Zytokine (wie IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF, G-CSF) und Chemokine (MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, RANTES, KC) hemmt, und somit einen limitierenden Faktor für die Dauer und Intensität einer Entzündung darstellt [17,34,36,52]. Der IL-10-Rezeptor ist ein Tetramer und besteht aus zwei Liganden bindenden Untereinheiten (IL-10R Alpha oder IL-10 R1) und zwei assoziierten Signal transduzierenden Untereinheiten (IL-10R Beta oder IL-10 R2). Autoregulatorisch bewirkt IL-10 eine Verminderung der IL-10-mRNA-Synthese in LPS aktivierten Monozyten. Über den JAK/STAT-Pathway und den MAP-Kinase-Pathway wird im Zellkern u. a. die Transkription von SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) induziert. SOCS 3 inhibiert durch die Bindung an JAK2 unterschiedliche Signaltransduktionen. Unter anderem wird die Signaltransduktion über den Erythropoetin-Rezeptor und den Prolaktin-Rezeptor gehemmt [78,165]. Durch Blockade von IL-10 mit Anti-IL-10-Antikörpern kommt es nach

Induktion einer entzündlichen Lungenverletzung durch IgG-Immun-Komplexe zu einem starken Anstieg der Lungenpermeabilität, einer Erhöhung der Konzentration an TNF-α in der bronchoalveolären Lavage und einem deutlichen Anstieg der Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage [180]. Dies verdeutlicht den hemmenden Einfluss von IL-10 auf inflammatorische Prozesse in der Lunge.

Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) gehört zu den CXC-Zytokinen (CXCL1) und gilt als homolog zu humanem GRO (Growth-regulated oncogene) [222] und murinem KC (Keratinocyte-derived cytokine) [214,213]. CINC-1 besitzt eine hohe chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten [213,220]. Durch CINC-1 wird die Expression von P-Selektin auf den Endothelzelloberflächen induziert [226]. Dadurch kommt es zu verstärktem Adhäsions- und Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten auch in die Lunge. Diese Migration kann durch Anti-CINC-1-Antikörper stark reduziert werden [110]. Daher spielt CINC-1 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von entzündlichen Vorgängen in der Lunge [56,81,182,220].

Macrophage inflammatory protein (MIP-1α) = CCL3 gehört wie MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) und RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) zu den pro-inflammatorischen chemotaktisch aktiven CC-Chemokinen. MIP-1α wird von verschiedenen Zellen, wie Alveolarmakrophagen [29] und neutrophilen Granulozyten [92], gebildet. Es wirkt über die Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 chemotaktisch auf Monozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten und Lymphozyten [181,155,115,168]. Bei der Entstehung einer LPS induzierten ALI kommt es zum Anstieg der MIP-1α-mRNA in Lungenhomogenisaten und einer Anreicherung an MIP-1α-Protein in den Alveolen [181]. Die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge und die Schädigung durch erhöhte pulmonale vaskuläre Permeabilität kann durch die Gabe von MIP-1α-Antikörpern gemindert werden [181]. Durch die Bindung von MIP-1α an CCR1 kommt es zur Sekretion von TNF-α und damit zur Verstärkung der Entzündungsreaktion [155].

Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) = CCL2 ist ein Chemokin, das chemotaktisch auf mononukleäre Zellen inklusive Alveolarmakrophagen wirkt [22,90,110]. Nach der Induktion einer Sepsis konnte jedoch auch auf neutrophilen Granulozyten die Ausbildung der nicht konstitutiv ausgebildeten MCP-1-Rezeptoren nachgewiesen werden [188]. Bei einer

durch Immunkomplexe induzierten ALI sowie auch nach einem Thoraxtrauma [177] erhöht sich die Konzentration von MCP-1 in der BAL. In daraus isolierten redundanten Alveolarmakrophagen sind erhöhte Konzentrationen von MCP-1-mRNA [22] nachweisbar. Auch im Überstand von Alveolarmakrophagen sind nach Thoraxtrauma erhöhte Konzentrationen von MCP-1 nachweisbar [177].

RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) = CCL5 gehört wie MIP-1α und MCP-1 zu den pro-inflammatorischen chemotaktisch aktiven CC-Chemokinen. RANTES bewirkt die Rekrutierung von Monozyten, T-Zellen und Alveolarmakrophagen [169],[206] und wird von T-Zellen, Alveolarmakrophagen [178] und Lungenepithelzellen [106] abgegeben. Im Maus-Modell führt die Instillation von LPS in die Lunge zu einer TNF-α abhängigen erhöhten Expression von RANTES-mRNA und RANTES-Protein in den alveolären Epithelzellen [206].

Fractalkine (CX_3CL1) ist das einzige bekannte Chemokin mit einer CX3C-Proteinstruktur und kommt in zwei Formen mit unterschiedlichen Funktionen vor [16]. Als membrangebundenes Molekül wird es von Endothelzellen, Neuronen, Epithelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert und dient als Adhäsionsmolekül für migrierende Leukozyten [54,107]. Durch TNF-α, IL-1 [16], INF-γ [84] und LPS [59] kommt es zu einer erhöhten Fractalkine-Expression auf Endothelzellen. Auch auf Epithelzellen wird durch Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF-α die Expression von Fractalkine erhöht [118]. Durch die beiden Metalloproteinasen ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase domain containing protein 10) [82] und TACE [199,61] kann der extrazelluläre Teil des Fractalkines abgespalten werden. In Lungengewebe von Ratten mit pulmonaler Hypertonie und lokaler Hypoxie konnte eine gesteigerte Expression von Fractalkine und seines Rezeptors CX_3CR1 nachgewiesen werden [150]. Neben wichtigen Funktionen bei der Adhäsion ist Fractalkine auch für die Phagozytose apoptotischer Zellen von Bedeutung. Wie oben beschrieben kann es als „find-me"-Signal von apoptotischen Lymphozyten abgegeben werden. Dies führt zu einer effizienteren Chemotaxis von Makrophagen in Richtung apoptotischer Lymphozyten und beschleunigt deren Ingestion [197]. Durch erhöhte Fractalkine-Konzentrationen kommt es zu einer gesteigerten Expression von MFG-E8, einem Opsonin für apoptotische Zellen [67,57]. Dabei führen erhöhte MFG-E8-Konzentrationen zu gesteigerten Phagozytoseaktivitäten der Makrophagen gegenüber apoptotischen Zellen [126,57]. Eine durch die ALI hervorgerufene Reduktion der

MFG-E8-Konzentration in der Lunge kann durch die intraperitoneale Gabe von rekombinantem MFG-E8 substituiert werden und führt wieder zu gesteigerter Phagozytose und der Suppression der lokalen Inflammation [126,57,32].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Beitrag des Fas/FasL-Systems zur Apoptoseinduktion im Lungenepithel nach Induktion eines stumpfen Thoraxtraumas und die Effektivität der Eliminierung der anfallenden apoptotischen Zellen durch Alveolarmakrophagen nach Thoraxtrauma zu ermitteln. Das stumpfe Thoraxtrauma stellt sowohl als isolierte Verletzung, als auch in Kombination mit anderen Verletzungen [198,97] eine der häufigsten Folgen von Verkehrsunfällen dar. Bei polytraumatisierten Patienten kommt es durch eine Beteiligung der Lunge zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zum respiratorischen Versagen, ARDS oder MOV [198] und damit zu einer signifikanten Erhöhung der Mortalitätsrate [58]. Die Schädigung des Lungenepithels und die Aktivierung des angeborenen Immunsystems sind die primären Reaktionen auf ein stumpfes Thoraxtrauma. Bereits in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden hierzu Untersuchungen im Maus- und Rattenmodell durchgeführt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es nach der Induktion eines Thoraxtraumas sowohl zu lokalen als auch zu systemischen Immunreaktionen kommt [99,147]. Nach einem stumpfen Thoraxtrauma kommt es zu einem Anstieg an apoptotischen AT2-Zellen im Lungenepithel [178] und einer Anreicherung an neutrophilen Granulozyten im bronchoalveolären Kompartiment [148].
Hieraus ergaben sich folgende Hypothesen:

- Die durch ein stumpfes Thoraxtrauma ausgelöste Apoptose der AT2-Zellen wird maßgeblich von den Alveolarmakrophagen bestimmt.
- Löslicher Fas-Ligand induziert in Alveolarmakrophagen und AT2-Zellen nach Thoraxtrauma die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine.
- Die Phagozytoseaktivität der Alveolarmakropagen wird durch ein Thoraxtrauma abgeschwächt.
- Nach einem Thoraxtrauma kommt es zu einer erhöhten Efferozytose-Aktivität der Alveolarmakrophagen gegenüber der im Alveolarraum auftretenden apoptotischen neutrophilen Granulozyten und AT2-Zellen.
- Schwefelwasserstoff hat, inhalativ nach Thoraxtrauma verabreicht, einen verstärkenden Effekt auf die Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Die Tierversuche wurden an männlichen CD-Ratten (Stamm Crl:CD(SD); Charles River, Sulzfeld, Germany) mit einem Körpergewicht von 250-275 g im Operationssaal des Tierhaltungsbereichs Safranberg des Universitätsklinikums Ulm durchgeführt, in dessen Räumlichkeiten die Tiere auch gehalten wurden. Im einzelnen Experiment wurden 5 bis 15 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt eingesetzt. Die Unterbringung der Tiere erfolgte zu maximal 3 Tieren pro Käfig bei einer Raumtemperatur von 21°C. Um einen gleichmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus zu erzeugen, wurde der Raum 12 Stunden belichtet und 12 Stunden abgedunkelt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Das Futter bestand aus einer standardisierten Versuchstiernahrung (Fa. Altromin, Lage-Lippe).
Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden von der zuständigen Behörde des Regierungspräsidiums Tübingen genehmigt (Tierversuch-Nr. 891, 964 und 1051).

2.2 Induktion eines Thoraxtraumas

Die Ratten wurden in einer Spülmaskennarkose durch ein Gasgemisch von 4 % Sevoflurane (Sevorane™ Abbott, Wiesbaden, Germany) und 96 % Sauerstoff unter einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 2 l/min anästhesiert. Die Tiere wurden anschließend in Rückenlage und mit abgespreizten Extremitäten fixiert. Brust und Bauch wurden rasiert. Zur genauen Platzierung des Druckwellengenerators wurden die Rippenbögen und das Sternum mit dem Processus xiphoideus markiert. Zur Unterscheidung der einzelnen Tiere wurden die Schwanzwurzeln durch Markierungen gekennzeichnet. Zur Induktion des stumpfen Thoraxtraumas wurde eine durch den Druckwellengenerator erzeugte Druckwelle entsprechend der von Jaffin et al. und Irwin et al. beschriebenen Methode kontaktlos zentral auf den Thorax appliziert [85,87]. Die sich anschließende Apnoephase wurde protokolliert. Nach dem Wiedereinsetzen der Spontanatmung wurde den Tieren 0,03 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Temgesic®, Boehringer, Mannheim) subkutan injiziert und die Narkose über die Spülmaske beendet. Die Kontrolltiere wurden ebenfalls in Anästhesie fixiert, rasiert und der Druckwellengenerator über ihnen ausgerichtet; es wurde jedoch keine Druckwelle appliziert. Die Schmerzmedikation beider Tiergruppen wurde in 8-stündigen Abständen wiederholt.

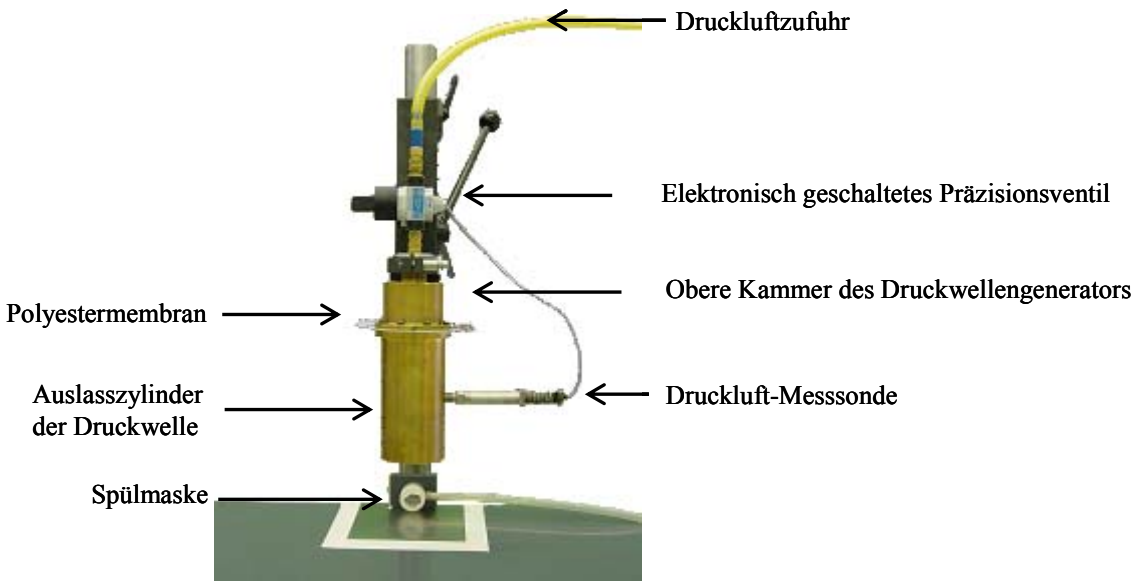

Abb. 4: Druckwellengenerator
Durch Auslösen des elektronischen Präzisionsventils (Hochgeschwindigkeitsventil) gelangt Druckluft in die obere Kammer des Druckwellengenerators. Hier kommt es zu einem schnellen Anstieg des Drucks und beim Erreichen des Berstdrucks zum Zerreißen der Polyestermembran, die die obere Kammer vom Auslasszylinder trennt. Die erzeugte Druckwelle wird durch den Auslasszylinder auf den Thorax der darunter positionierten Ratte gelenkt. Die Inhalationsnarkose wird über die an die Spülmaske angeschlossene Narkose-Einheit gesteuert.

2.3 Behandlung mit Schwefelwasserstoff (H_2S)

Zur Behandlung der Ratten mit H_2S wurden die nach Applikation des Thoraxtraumas bzw. der Kontrollbehandlung und der subkutanen Injektion von 0,03 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Temgesic®, Boehringer, Mannheim) spontan atmenden und vollständig erwachten Ratten in Plexiglas-Expositionskammern umgesetzt (Abb. 5). Zur H_2S- oder Kontroll-Gas-Inhalation wurde eine Durchflussrate von 1,25 l/min durch die Expositionskammer gewählt. Das Gasgemisch des Kontroll-Gases setzte sich aus 20 % Sauerstoff (O_2) und 80 % Stickstoff (N_2) zusammen. Dem H_2S-Gasgemisch wurde zusätzlich zu den Komponenten des Kontrollgases noch 100 ppm H_2S beigemischt. Nach Beendigung der sechsstündigen Expositionszeit wurden die Kammern für 10 Minuten mit dem Kontrollgas geflutet, um das H_2S-Gas auszuspülen und ein Ausströmen größerer H_2S-Mengen bei der Entnahme der Ratten aus der Expositionskammer zu verhindern. Die Ratten wurden anschließend aus den Kammern entnommen und entweder sofort zur Organentnahme getötet (6-Stunden-Zeitpunkt) oder unter oben genannter Schmerzmedikation und Normalbedingungen im Tierhaltungsbereich bis zum Tötungszeitpunkt gehalten.

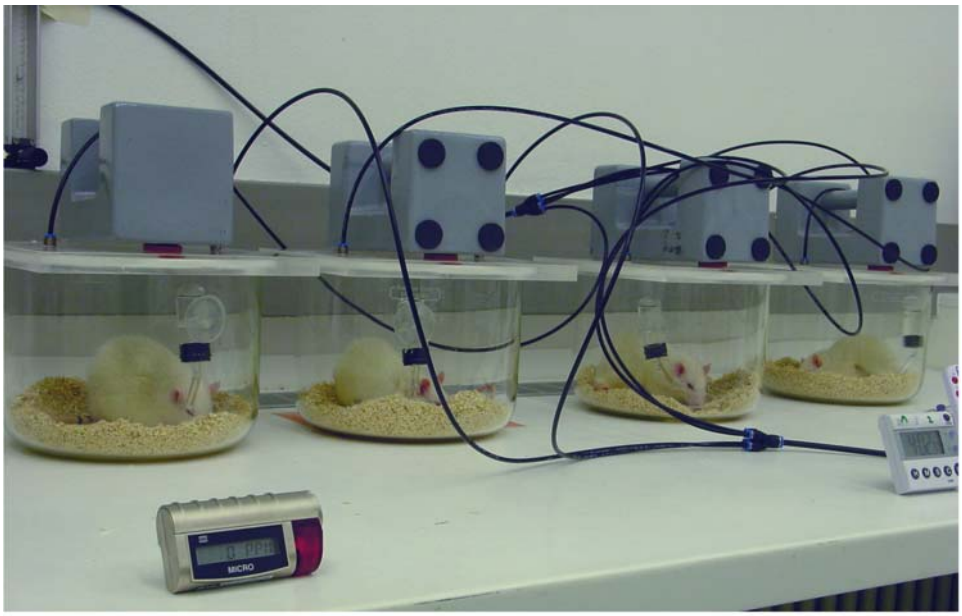

Abb. 5 Expositionskammern zur H_2S- oder Kontroll-Gas-Inhalation männlicher CD-Ratten
Nach Applikation des Thoraxtraumas bzw. der Kontrollbehandlung wurden die spontan atmenden und vollständig erwachten Ratten dem Kontroll-Gas aus 20 % Sauerstoff (O_2) und 80 % Stickstoff (N_2) bzw. dem H_2S-Gasgemisch mit zusätzlich 100 ppm H_2S in diesen Glas-Expositionskammern ausgesetzt. Über das zuführende Schlauchsystem mit Mehrfachverteiler (von vorn) konnten 4 Kammern parallel mit dem Gasgemisch versorgt werden, das bei einer Durchflussrate von 1,25 l/min über abführende Schläuche wieder entfernt wurde. Nach sechsstündiger Exposition wurden die Tiere entweder sofort zur Organentnahme und Durchführung der bronchoalveolären Lavage mit Isolation der Alveolarmakrophagen getötet (6-Stunden-Zeitpunkt) oder unter Normalbedingungen in Tierhaltungsbereich in Käfigen bis zum Tötungszeitpunkt 24 oder 48 Stunden nach Thoraxtrauma bzw. Kontrolleingriff gehalten.

2.4 Probenmaterial

2.4.1 Töten der Versuchstiere durch Ausbluten

Zur Entnahme des Probenmaterials wurden die Ratten zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma durch Ausbluten in tiefer Narkose getötet. Die Narkotisierung erfolgte durch die intraperitoneale Gabe von Xylazin (Xylazinhydrochlorid 2 mg/kg Körpergewicht, Alvetra, Neumünster, Germany) und Ketamin (Ketaminhydrochlorid 100 mg/kg Körpergewicht, Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Germany) im Verhältnis 1:1. Das Blut wurde hierzu aus der Aorta mittels eines peripheren Venenkatheters (*Insyte-W*™ BD, Heidelberg, Germany) und einer EDTA-Monovette® (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany) entnommen. Die Blutproben wurden bei 500 × g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand (Plasma) abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.4.2 Gewinnung der bronchoalveolären Lavage (BAL) und Isolation der Alveolarmakrophagen (AMΦ)

Je nach Versuchsansatz wurden die Ratten 4, 6, 16, 24, 48 oder 72 Stunden nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma wie oben beschrieben getötet, die Trachea kanüliert und die Lunge mit 5 ml eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung DPBS (Dulbecco's PBS, Gibco BRL; Grand Island, NY) gespült. Die Spülflüssigkeit (BAL1) wurden in einem 15 ml Falcon aufgenommen und kühl gelagert. Um möglichst viele AMΦ zu isolieren, wurde die Lunge achtmal mit 10 ml DPBS (BAL2) gespült und die Spülflüssigkeit in zwei 50 ml-Falcons aufgenommen. Anschließend wurden die BALs bei 450 × g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand von BAL1 zur Bestimmung der Mediatoren bei -80°C eingefroren, der Überstand von BAL2 verworfen und die Zellpellets von BAL1 und BAL2 zusammengeführt. Noch vorhandene Erythrozyten wurden durch zweimalige Zugabe von 10 ml sterilem, destilliertem Wasser mit viermaligem Auf- und Abpipettieren und anschließender Zugabe von 5 ml 2,7 % NaCl und 30 ml kaltem DPBS lysiert. Danach wurde erneut bei 450 × g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, New York, USA) resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauerzählkammer mit Kristallviolett in einer Verdünnung von 1:10. Anschließend wurden die Zellen auf 24-well-Petrischalen (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) in einer Konzentration von 3×10^6 /ml DMEM ausgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C und 5 % CO_2 wurden die Kulturen mit DMEM gewaschen.

AMΦ, in deren Kulturüberstand die Konzentration von löslichem Fas-Ligend (sFasL) analysiert werden sollte, wurden 6, 24 und 48 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollbehandlung isoliert und bei 37°C und 5 % CO_2 in DMEM mit 0,5 % fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin, Deutschland) kultiviert.

AMΦ, deren Kulturüberstand nach Stimulation mit 500 ng/ml sFasL auf IL-6, IL-10 und MCP-1 analysiert werden sollte, wurden 24 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollbehandlung isoliert und bei 37°C und 5 % CO_2 in DMEM mit 0,5 % FCS kultiviert.

AMΦ, die für die RNA-Isolation vorgesehen waren, wurden wie unter 2.4 beschrieben, weiterverarbeitet.

Die für den Phagozytose-Assay vorgesehenen AMΦ wurden nach zweimaligem Waschen mit HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+} und nach Zugabe von jeweils 500 µl RPMI /well 1 Stunde bei 37°C und 5 % CO_2 bis zur Zugabe der zu phagozytierenden Materialien kultiviert.

Verwendete Puffer und Lösungen:

DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+}	2,67 mM KCl; 1,47 mM KH_2PO_4, 137,91 mM NaCl; 8,06 mM Na_2HPO_4-$7H_2O$ # 14190-094; Gibco
DMEM	DMEM; # 41966; Gibco + 10 ml Nicht-essentielle Aminosäuren; # 11140-035; Gibco + 10 ml Penicillin/ Streptomycin; # 15140-122; Gibco + 10 ml L-Glutamin; # 25030-024; Gibco
$DMEM^+$ + 0,5 % FCS	500 ml DMEM + 2,5 ml hitzeinaktiviertes FCS; # S 0115; Biochrom KG
RPMI Medium 1640 + 10 % FCS	# E15-840; PAA + 55 ml hitzeinaktiviertes FCS; # S 0115; Biochrom KG + 10 ml Nicht-essentielle Aminosäuren; # 11140-035; Gibco + 10 ml Penicillin/ Streptomycin; # 15140-122; Gibco + 10 ml L-Glutamin; # 25030-024; Gibco
HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+}	1,26 mM $CaCl_2$, 0,493 mM $MgCl_2$-$6H_2O$; 0,407 mM $MgSO_4$-$7H_2O$; 5,33 mM KCl; 0,441 mM KH_2PO_4; 4,17 mM $NaHCO_3$; 137,93 mM NaCl; 0,338 mM $NaHPO_4$; 5,56 mM D-Glucose # 14025-100; Gibco

2.4.3 Isolation von Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen)

Zur Isolation der AT2-Zellen wurden unbehandelte Tiere sowie Kontroll- und Traumatiere, wie oben beschrieben, getötet. Der Lungenkreislauf wurde durch Injektion von ca. 10 ml DPBS in den rechten Vorhof gespült. Die Trachea wurde kanüliert, die Lunge 8-mal unter vorsichtigem Massieren des Thorax mit 10 ml kaltem DPBS gespült, mit Trachea und Herz herauspräpariert und in 500 ml kaltes 0,9 % NaCl (Fresenius Kabi, Bad Homburg Deutschland) überführt. Im Labor wurde die kanülierte, aufgehängte Lunge in 500 ml 37°C

warmem DPBS 500 leicht flottiert. Über den Trachealkatheter konnte dann die in 40 ml DPBS gelöste Elastase-Lösung (172 U) (Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA) innerhalb von 20 Minuten infundiert werden. Danach wurde unter sterilen Bedingungen der Hilus und das Herz entfernt, die Lunge in ein 50 ml-Falcon mit auf 37°C vortemperierter DNase I-Lösung (1000 U; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) überführt und in diesem mit einer Schere mechanisch zerkleinert. Das Homogenisat wurde in einen 50 ml-Erlenmeyerkolben überführt. Um den DNAse-Verdau zu stoppen, wurden dann 5 ml Ultra Low IgG FBS (Life Technologies, Rockville, MD, USA) zugegeben und 20 Minuten auf einem Magnetrührer forciert bei Raumtemperatur gemischt. Anschließend wurde das Homogenisat sukzessive über Polyester-Filter (VWR International, Darmstadt, Deutschland) mit Porengrößen von 500 nm, 200 nm und 100 nm filtriert, auf 40 ml mit DMEM aufgefüllt und bei 450 × g und 4°C 10 Minuten 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 und interstitielle Makrophagen zu entfernen, wurden jeweils 10 ml der Zellsuspension auf 4 mit Ratten-IgG (10 µg/ml, Sigma-Aldrich) beschichteten Petrischalen (100 x 15 mm, Becton Dickinson & Company) ausgebracht und für 1 Stunde bei 37°C in 5 %-iger CO_2-Atmosphäre inkubiert. Nachdem die Makrophagen adhärierten, konnten die AT2-Zellen im Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert werden. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml 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, durch ein 100 µm-Filter (BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA) filtriert, gezählt und die Vitalität der Zellen durch Anfärbung mit Trypanblau festgestellt.
AT2-Zellen aus unbehandelten Tieren, die für die Apoptose-Induktion mittels UVC-Strahlen und den anschließenden Phagozytoseversuch vorgesehen waren, wurden jetzt kultiviert. Jeweils 2 ml der AT2-Zell-Suspension in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml Medium ($DMEM^+$ + 10 % FCS) wurde in eine Kavität einer 6-Well-Platte (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, USA) ausgebracht und 48 Stunden bei 37°C in 5 % CO_2 kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen gewaschen und für weitere 18 Stunden in frischem Mangelmedium (DMEM + 0,5 % FCS) kultiviert.

Verwendete Puffer und Lösungen:

DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+} # 14190-094; Gibco

0,9 % NaCl-Lösung	# 46473; Fresenius Kabi
Elastase-Lösung	40 ml DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+}; # 14190-094; Gibco + 172 U Pankreas-Elastase; # LS 002279; Cellsystems
DNase I-Lösung	8 ml DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+}; # 14190-094; Gibco + 2000 U DNase I; # D4263; Sigma
Ultra Low IgG FBS	# 16250-086; Life Technologies
DMEM	DMEM; # 41966; Gibco + 10 ml Nicht-essentielle Aminosäuren; # 11140-035; Gibco + 10 ml Penicillin/ Streptomycin; # 15140-122; Gibco + 10 ml L-Glutamin; # 25030-024; Gibco
Ratten IgG-Lösung	10 ml DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+}; # 14190-094; Gibco + 10 µg Ratten IgG; # I-8015; Sigma
DMEM + 10 % FCS	500 ml DMEM; # 41966; Gibco + 55 ml hitzeinaktiviertes FCS; # S 0115; Biochrom KG + 10 ml Nicht-essentielle Aminosäuren; # 11140-035; Gibco + 10 ml Penicillin/ Streptomycin; # 15140-122; Gibco + 10 ml L-Glutamin; # 25030-024; Gibco
DMEM + 0,5 % FCS	500 ml DMEM; # 41966; Gibco + 2,5 ml hitzeinaktiviertes FCS; # S 0115; Biochrom KG + 10 ml Nicht-essentielle Aminosäuren; # 11140-035; Gibco + 10 ml Penicillin/ Streptomycin; # 15140-122; Gibco + 10 ml L-Glutamin; # 25030-024; Gibco

2.4.4 Isolation von neutrophilen Granulozyten (PMN)

Unbehandelte Ratten wurden in tiefer Narkose durch Entbluten aus der Aorta getötet. Das dabei gewonnene heparinisierte Blut (Heparin-Natrium, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) (15 ml) wurde mit 0,9 % NaCl verdünnt und über Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Piscataway, USA) geschichtet. Nach der Zentrifugation (30 min, 340 × g) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit Erythrozyten und Granulozyten vorsichtig mit 0,9 % NaCl (B Braun Melsungen AG) resuspendiert und mit 5 % Dextran (Sigma) gemischt. Um ein Absedimentieren der Erythrozyten zu ermöglichen, wurde diese Zellsuspension bei geöffnetem Deckel 45 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überstand mit den darin enthaltenen Granulozyten wurde anschließend abgenommen, mit 0,9 % NaCl verdünnt und 5 Minuten bei 530 × g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Um restliche Erythrozyten zu lysieren, wurde das Pellet mit 10 ml sterilem destilliertem Wasser versetzt und der osmotische Druck anschließend durch sofortige Gabe von 5 ml 2,7 % NaCl wieder ausgeglichen. Nach Auffüllen der Zellsuspension mit 0,9 % NaCl auf 40 ml wurde diese erneut zentrifugiert (5 Minuten bei 530 × g und RT). Nach dem Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in 2 ml HBSS ohne $Mg^{2+/}Ca^{2+}$ (Gibco) aufgenommen, mit Trypanblau gefärbt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die darauf folgende Anfärbung und Apoptose-Induktion der neutrophilen Granulozyten wurden wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt.

Verwendete Puffer und Lösungen:

0,9 % NaCl-Lösung	# 387028R; B Braun Melsungen AG
Ficoll-Paque PLUS	# 17-1440-03; GE Healthcare Bio-Sciences AB
Dextran	# D1037; Sigma
HBSS w/o $Mg^{2+/}Ca^{2+}$	5,33 mM KCl;0,441 mM KH_2PO_4; 4,17 mM $NaHCO_3$; 137,93 mM NaCl; 0,338 mM $NaHPO_4$; 5,56 mM D-Glucose # 14025; Gibco

2.5 Aufreinigung der Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) oder Alveolarmakrophagen (AMΦ) durch Selektion der neutrophilen Granulozyten (PMN)

Zur weiteren Aufreinigung der AT2-Zellen bzw. AMΦ, die für die mRNA-Isolation bestimmt waren, wurden die PMN durch Bindung an magnetische Beads aus den Zelllösungen selektiert. Dazu wurde der EasySep® PE Selection Kit (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) verwendet.

Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 450 × g und 4°C wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 x 10^8/ml im Selektions-Puffer (DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+} + 1 mM EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA + 2 % FCS) resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Ratten-IgG (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) zur Blockierung unspezifischer Bindungen, kurzem Vortexen und anschließender Zugabe von 5 µl Anti-rat-Granulocytes-PE (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) pro 100 µl Zellsuspension inkubierten die Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden danach mit Selektionspuffer gewaschen. Dazu wurden sie 5 Minuten bei 450 × g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet in einer Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml resuspendiert und der EasySep® PE Selection Cocktail (StemCell Technologies) in einer Konzentration von 200 µl/ml zugegeben. Nach erneuter 15-minütiger Inkubation bei RT wurden die EasySep® magnetic nanoparticles (StemCell Technologies) in einer Konzentration von 100 µl/ml zugegeben und 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellsuspension wurde nun auf ein Gesamtvolumen von 5 ml durch Zugabe von Selektionspuffer aufgefüllt und auf zwei FACS-Röhrchen (BD) verteilt. Diese wurden für 10 Minuten in den Magneten inkubiert. Dadurch wurden die PMN an der Röhrchenwand festgehalten. Durch Abkippen der in den Magneten stehenden Röhrchen in ein 15 ml-Falcon konnte die Zellsuspension von den adhärenten PMN gereinigt werden. Diese Zellsuspension wurde erneut auf zwei FACS-Röhrchen verteilt und die magnetische Selektion der PMN durchgeführt. Nach dem Abkippen der Zellsuspension mit AT2-Zellen bzw. AM in ein 15 ml-Falcon wurde dieses 5 Minuten bei 4°C und 450 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 500 ml DPBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde mikroskopisch in einer 1:10-Verdünnung mit Kristallviolett bestimmt und die Reinheit der Zellen überprüft.

Zellen, die zur RNA-Isolation vorgesehen waren, wurden anschließend 5 Minuten bei 4°C und 450 × g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 600 µl Lysepuffer gelöst, kurz gevortext und bei -80°C eingefroren.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Selektions-Puffer	DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+}; # 14190-094; Gibco 1 mM EDTA; # E6758; Sigma
EasySep® PE Selection Kit	# 18557; StemCell Technologies
Ratten-IgG	# CB6411604; Caltag Laboratories
Anti-rat-Granulocytes-PE	# 550002; BD Biosciences
DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+}	# 14190-094; Gibco

2.6 Stimulation der Alveolarmakrophagen (AMΦ) und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) durch löslichen Fas-Ligand (sFasL)

Um die Effizienz der Apoptose-Induktion durch löslichen Fas-Ligand (sFasL) zu ermitteln, wurden AT2-Zellen aus unbehandelten Ratten, wie unter 2.4.3 beschrieben, isoliert und auf gekammerten 8-Well-Objektträgern ausgebracht. Sie wurden dann mit löslichem Fas-Ligand (soluble Fas-Ligand, Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA) in den Konzentrationen 0 ng/ml, 50 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml in DMEM + 5% FCS 18 Stunden bei 37°C in 5 %-iger CO_2-Atmosphäre inkubiert. Die Fixierung für die anschließende Annexin V-Färbung erfolgte durch Zugabe von 27 µl 4°C-kaltem 37%-igem Formalin in 250 µl Medium. Nach einstündiger Inkubation im Kühlschrank wurde das formalinhaltige Medium abgenommen und die Zellen mit 500 µl DPBS überschichtet. In diesem Zustand wurden die Zellen bis zur Annexin V-Immunfluoreszenzfärbung (2.7) im Kühlschrank aufbewahrt. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Stephanie Mangold durchgeführt und bereits in ihrer Doktorarbeit „Apoptose von Alveolarepithelzellen Typ II nach stumpfem Thoraxtrauma – Rolle der Alveolarmakrophagen“ ausgeführt [178].

Um die Apoptose induzierende Wirkung des löslichen Fas-Ligand auf AMΦ zu ermitteln, wurden die AMΦ ebenfalls aus unbehandelten Ratten, wie unter 2.4.2 beschrieben, isoliert und in den oben erwähnten Konzentrationen in DMEM + 5% FCS mit sFasL 18 Stunden bei 37°C in 5 %-iger CO_2-Atmosphäre in 35mm-Petrischalen (Corning, USA) inkubiert. Nach

Zugabe von Trypsin-EDTA und anschließender Inkubation, davon 30 Sekunden bei 37°C in 5%-iger CO_2-Atmosphäre und 1 Minute auf Eis, wurden die AMΦ nach dem Abstoppen der Reaktion mit DMEM + 5% FCS vorsichtig mit dem Zellschaber von der Petrischale gelöst. Der Apoptosenachweis der AMΦ wurde direkt im Anschluss mit dem ANNEXIN V-FITC/7-AAD KIT (Beckman Coulter, Fullerton, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.
Die zur Messung der Zytokin-Konzentrationen im Kulturüberstand vorgesehenen Zellen wurden, wie unter 2.4.2 und 2.4.3 beschrieben, 24 Stunden nach Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung isoliert. Die AMΦ wurden in einer Konzentration von 3×10^6 /ml und die AT2-Zellen in 1×10^6 /ml auf 24-well-Zellkulturschalen (Becton Dickinson & Company) ausgebracht und 24 Stunden in DMEM + 0,5 % FCS bei 37°C in 5 %-iger CO_2-Atmosphäre kultiviert. Zur Stimulation wurde den Zellkulturen 500 ng/ml löslicher Fas-Ligand (sFasL; soluble Fas-Ligand, Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA) zugesetzt. Die jeweils mitgeführten unstimulierten Kontrollen wurden mit dem identischen Volumen DPBS versetzt.

Verwendete Puffer und Lösungen:

$DMEM^+$ + 0,5 % FCS	500 ml DMEM; # 41966; Gibco + 2,5 ml hitzeinaktiviertes FCS; # S 0115; Biochrom KG + 10 ml Nicht-essentielle Aminosäuren; # 11140-035; Gibco + 10 ml Penicillin/ Streptomycin; # 15140-122; Gibco + 10 ml L-Glutamin; # 25030-024; Gibco
Löslicher Fas-Ligand	# FL-101; Kamiya Biomedical Company
DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+}	# 14190-094; Gibco
0,25 % Trypsin-EDTA	0,1 mM Trypsin, 0,9 mM EDTA # 25200-056; Gibco
37 % Formalinlösung	# 7040; Baker

2.7 Apoptose-Nachweis durch Annexin V–Immunfluoreszenzfärbung

Die für die Annexin V-Färbung, wie unter 2.6 beschrieben, vorbereiteten AT2-Zellen wurden jeweils zweimal mit DPBS und zweimal mit TNT-Puffer gewaschen. Um unspezifische Fc-Fragmente zu blockieren, wurden die AT2-Zellen im Anschluss für 45 min mit 500 µl TNB-Puffer pro Well inkubiert. Danach wurden die Kammern vom Objektträger entfernt und jeweils 50 µl des 1:50 mit TNB-Puffer verdünnten Antikörpers (anti-human Annexin V (rekombinant) Biotin, Hölzel Diagnostika, Köln) pro Kammer aufgetragen. In einer feuchten Kammer wurden die Objektträger für 1 Stunde inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit TNT-Puffer folgte die Inkubation der Zellen mit 50 µl/Well Streptavidin-Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach dem anschließenden Waschen mit TNT-Puffer wurden die Zellkerne durch ein 15-minütiges Einbringen der Objektträger in eine Bisbenzimid-Lösung (Sigma-Aldrich) angefärbt. Es folgte noch ein weiterer Waschschritt mit TNT-Puffer, bevor die Zellen nun mikroskopisch beurteilt werden konnten.

Verwendete Puffer, Lösungen und Antikörper:

TNB-Puffer	0,1 M Tris-HCl #75825; USB Corporation, 0,15 M NaCl # 71380; Fluka, 0,5% Albumin # A8022; Sigma, 2 mM $CaCl_2$ # C3306; Sigma gelöst in ddH_2O pH auf 7,5 eingestellt
TNT-Puffer	0,1 M Tris-HCl #75825; USB Corporation, 0,15 M NaCl # 71380; Fluka, 2 mM $CaCl_2$ # C3306; Sigma 0,05% Tween # gelöst in ddH_2O pH auf 7,5 eingestellt
Bisbenzimid-Lösung	1 mg Bisbenzimid # B2883; Sigma + 1 ml TNT-Puffer gelöst; in 500 ml TNT-Puffer überführt;

	Lagerung lichtgeschützt bei RT.
DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+}	# 14190-094; Gibco
AnnexinV (rekombinant) Biotin	# 209-002-T100; Hölzel Diagnostika
Streptavidin Alexa Fluor 568	# S11226; Molecular Probes

2.8 Durchflusszytometrische Analyse (FACS) von Fas und Fas-Ligand auf Alveolarmakrophagen (AMΦ) und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen)

Die AMΦ und AT2-Zellen wurden 4 und 16 Stunden nach Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung, wie oben beschrieben, isoliert und die neutrophilen Granulozyten durch magnetische Selektion entfernt (siehe 2.4 und 2.5).

Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde der Leucoperm-Kit (AbD Serotec, Raleigh, USA) verwendet. Anschließend wurden beide Zellpopulationen mit folgenden Antikörpern 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert: Isotype rabbit-IgG (Beckman-Coulter), Anti-Fas (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) oder Anti-Fas-Ligand (Santa Cruz Biotechnology). Zur Detektion der AT2-Zellen wurden diese zusätzlich mit Anti-cytokeratin MNF Clone 116 (Dako, Carpinteria, CA) inkubiert. Als Detektions-Antikörper für Fas und Fas-Ligand wurde Goat-anti-rabbit-PE (Beckman-Coulter) genutzt. AT2-Zellen wurden zusätzlich mit goat-anti-mouse-SPRD (Spectral Red™, Beckman-Coulter) als sekundären Antikörper für MNF 116 gefärbt. Nach 25-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen gewaschen und durchflusszytometrisch am BD FACSCanto™ II (BD, Heidelberg, Germany) gemessen. Der Anteil an Fas bzw. FasL positiven Zellen wurde mit der FACSDiva™-Software (BD) ermittelt.

Verwendeter Puffer und Lösungen:

FACS-Puffer	DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+} + 1 % Bovines Serumalbumin (BSA); # A8022; Sigma
Leucoperm-Kit	# BUF09; AbD Serotec

Verwendete Antikörper:

Primärantikörper

Isotype Rabbit IgG	# 731642; Beckman Coulter
Anti-Fas / Rabbit polyclonal IgG	# sc-716; Santa Cruz
Anti-FasL / Rabbit polyclonal IgG	# sc-834; Santa Cruz
Anti-Cytokeratinin / MNF clone 116	# M0821; Dako

Sekundärantikörper

Goat-Anti-Rabbit-PE	# 732751; Beckman Coulter
Goat-Anti-Mouse-SPRD	# 731858; Beckman Coulter

2.9 RNA-Isolation

AMΦ and AT2-Zellen wurden, wie oben beschrieben, isoliert. Die Isolation der mRNA der Zellen wurde mit Absolutely RNA Miniprep Kit (Stratagene, Cedar Creek, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde ein zusätzlicher DNase-Verdau vorgenommen. Anschließend wurden die RNA-Proben mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben gereinigt und aufkonzentriert.

Verwendeter Puffer und Lösungen:

Absolutely RNA Miniprep Kit	# 400800; Stratagene
RNeasy MinElute Cleanup Kit	# 74204; Qiagen

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die relativen Quantitäten der mRNA von Fas und FasL wurden mittels RT-PCR ermittelt. Die Reverse Transkriptions-Reaktion wurde mit 2 µg der Gesamt-RNA in einem Volumen von 40 µl mit Hilfe des AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kits (Stratagene, Cedar Creek, USA) und nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 42°C zur Reversen Transkription wurden die Proben zur Denaturierung 5 Minuten bei 95°C

inkubiert. Alle Proben wurden dann 1:5 verdünnt und bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Die quantitative Real-time PCR wurde im Mx3000P QPCR System mit der dazugehörenden Software (MxPro; Stratagene, Cedar Creek, USA) in Kombination mit dem Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, Cedar Creek, USA) durchgeführt. Fas-, FasL, Surfactant-Protein-D- und B2M-Primer konnten als QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Hilden, Germany) erworben werden.

Tabelle 1: Verwendete Primer und deren Produktlänge

Gen:	Primer:	Produktlänge (bp):
Fas	QuantiTect Primer Assay Kat.-Nr. QT00196595	71
FasL	QuantiTect Primer Assay Kat.-Nr. QT00178171	100
SP-D	QuantiTect Primer Assay Kat.-Nr. QT00184114	127
B2M	QuantiTect Primer Assay Kat.-Nr. QT00176295	61

Im Reaktionsansatz waren jeweils 2,5 µl des Primer-Assays (Qiagen, Hilden, Deutschland), 5 µl der cDNA und 17,5 µl des 1 × Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, Cedar Creek, USA). Nach der 10-minütigen initialen Denaturierung bei 95°C wurden die PCR-Läufe unter den in Tabelle 2 erläuterten Amplifikations-Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 2: PCR-Temperaturprofil

Denaturierung:	Annealing:	Extension:	Zyklenzahl:
94°C; 15s	55°C; 30s	72°C; 30s	40

Durch die sich anschließende, kontinuierliche Erwärmung von 55°C auf 95°C wurde die Schmelzkurvenanalyse vorgenommen. Dabei wird die Denaturierung der DNA-Amplifikate an ihrer spezifischen Schmelztemperatur in der graphischen Darstellung durch einen Peak deutlich. Dessen Höhe gibt semiquantitativ Auskunft über die Anzahl an Amplifikations-Produkte. Für jede Probe wurden eine Negativ- und eine No-RT-Kontrolle mitgeführt. Jede

PCR-Analyse wurde als Triplikat durchgeführt. Die Genexpression beider Zelltypen (AT2-Zellen und AMΦ) wurde auf das Housekeeping-Gen Beta-2-Mikroglobulin (B2M) normalisiert. Die Expressionsveränderung wurden mit der ΔΔCt-Methode errechnet und als relative Genexpression der traumatisierten Tiere gegenüber der Genexpression der entsprechenden Kontrolltiere angegeben. Für die statistische Auswertung wurde der Logarithmus (log2) der ΔΔCt-Werte verwendet.

2.11 Anfärben der Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) und der neutrophilen Granulozyten (PMN) mit anschließender Apoptose-Induktion durch ultraviolette Strahlung

Um in den Phagozytose-Versuchen die ingestierten Zellen in den phagozytierenden AMΦ nachweisen zu können, wurden die aus unbehandelten Tieren isolierten AT2-Zellen und PMN mit CellTracker™ CM-DiI (Invitrogen / Molecular Probes, Eugene, USA) markiert. Die lipophile Indocarbocyanin-Verbindung DiI führt nach Aufnahme durch die Zellen und Einlagerung in Zellmembranen zu einer orange-roten Fluoreszenzfärbung der Zelle. Diese ist mit einer maximalen Anregungswellenlänge von 553 nm und einer Emissionswellenlänge von 570 nm nachweisbar.

Der Zellrasen der AT2-Zellkulturen (siehe oben) wurde zweimal kräftig mit DMEM gewaschen, mit 5 µM CM-DiI in DMEM + 0.5 % FCS versetzt und 15 Minuten bei 37°C in 5 % CO_2-Atmosphäre und dann 10 Minuten auf Eis inkubiert. Um restliches CM-DiI zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit HBSS+Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen und anschießend bis zur weiteren Verarbeitung mit 1 ml HBSS+Ca^{2+}/Mg^{2+} überschichtet. Zur Apoptose-Induktion wurden die AT2-Zellen 5 Minuten bei geöffnetem Deckel der Zellkulturplatte mit UV-C-Strahlung (254 nm), was 2100 Joules/m^2 entspricht, bestrahlt und bei 37°C in 5 % CO_2-Atmosphäre inkubiert. Nach 30 Minuten wurde der Kulturüberstand vorsichtig entfernt, 2 ml HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+} auf den Zellrasen gegeben und die AT2-Zellen 4,5 Stunden bei 37°C in 5 % CO_2 –Atmosphäre inkubiert. Durch Abnehmen des Kulturüberstands, dessen 5-minütige Zentrifugation bei 530 × g bei RT und Resuspendieren des Pellets in RPMI (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) + 10 % FCS wurden die bereits abgelösten apoptotischen AT2-Zellen aufgenommen. Die noch adhärenten AT2-Zellen wurden vorsichtig mit HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen. Anschließend wurden durch Zugabe von Trypsin-EDTA (0.25 % Trypsin, 0,9 mM EDTA) (Gibco) und 5-minütiger Inkubation bei 37°C in 5 % CO_2-Atmosphäre die AT2-Zellen abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von RPMI

+ 10 % FCS abgestoppt, die Zellen kräftig von der Zellkulturplatte abgespült, die AT2-Zellen von je 2 Wells durch ein 100 µm-Zellsieb gespült und in einem 50 ml-Falcon aufgenommen (Endvolumen: 25 ml Zellsuspension). Diese Zellsuspension wurde 5 Minuten mit 450 × g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,5 ml RPMI + 10 % FCS resuspendiert.

Zum Anfärben der frisch isolierten neutrophilen Granulozyten wurden diese nach 5-minütiger Zentrifugation bei 530 × g bei RT in einer Konzentration von $2{,}5x10^6$ /ml in 5 µM HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+}+CM-DiI aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde 15 Minuten im Schüttelwasserbad (50 rpm) bei 37°C und anschließend 10 Minuten auf Eis inkubiert. Um überschüssiges DiI zu entfernen, wurden die Zellen nach erneuter Zentrifugation bei 530 × g 5 min bei RT zweimal mit HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen, dann in einer Konzentration von $2{,}5x10^6$ /ml in HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+} aufgenommen und je 500 µl der Zellsuspension in eine Kavität einer 24-well-Zellkulturplatte ausgebracht. Zur Apoptose-Induktion wurden die neutrophilen Granulozyten 5 Minuten bei geöffnetem Deckel der Zellkulturplatte mit UV-C-Strahlung (254 nm) bestrahlt und 2,5 Stunden bei 37°C in 5 % CO_2-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 15 ml-Falcons überführt und 5 Minuten bei 530 × g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer Konzentration von $2{,}5x10^6$ /ml in RPMI + 10 % FCS resuspendiert.

Verwendete Puffer und Lösungen:

CellTracker™ CM-DiI	# C-7001; Invitrogen / Molecular Probes
DMEM	DMEM; # 41966; Gibco + 10 ml Nicht-essentielle Aminosäuren; # 11140-035; Gibco + 10 ml Penicillin/ Streptomycin; # 15140-122; Gibco + 10 ml L-Glutamin; # 25030-024; Gibco
HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+}	# 14025-100; Gibco
RPMI Medium 1640 + 10 % FCS	# E15-840; PAA + 55 ml hitzeinaktiviertes FCS; # S 0115; Biochrom KG + 10 ml Nicht-essentielle Aminosäuren; # 11140-035; Gibco

	+ 10 ml Penicillin/ Streptomycin; # 15140-122; Gibco + 10 ml L-Glutamin; # 25030-024; Gibco
0,25 % Trypsin-EDTA	0,1 mM Trypsin, 0,9 mM EDTA # 25200-056; Gibco

2.12 Opsonierung der Latexpartikel

Die für den Phagozytose-Assay benutzten Latexpartikel (Fluoresbrite ™ Carboxylate 0.75 Micron Microspheres, Polysciences, Warrington, USA) wurden mit Rattenserum opsoniert. Dafür wurden 2,5 µl der Latexpartikel-Suspension (Konzentration von 1 x 10^{11}/ml) zu 123 µl HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+} und 125 µl Rattenserum gegeben und 30 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad (90 rpm) im Dunkeln inkubiert. Durch Auffüllen des 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchens und anschließender 5-minütiger Zentrifugation bei 4000 × g und RT wurden die Latexpartikel gewaschen und dann mit HBSS auf eine Konzentration von 2,5 x 10^9/ml resuspendiert. Um einer etwaigen Verklumpung entgegen zu wirken, wurde die Partikelsuspension ca. 45 Sekunden in das Ultraschallbad getaucht. Für den Einsatz im Phagozytose-Assay wurden 20 µl der Partikelsuspension zu 4,98 ml RPMI + 10 % FCS gegeben.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Fluoresbrite ™ Carboxylate 0.75	# 07766-10; Micron Microspheres, Polysciences
HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+}	# 14025-100; Gibco
RPMI Medium 1640 + 10 % FCS	# E15-840; PAA + 55 ml hitzeinaktiviertes FCS; # S 0115; Biochrom KG + 10 ml Nicht-essentielle Aminosäuren; # 11140-035; Gibco + 10 ml Penicillin/ Streptomycin; # 15140-122; Gibco

+ 10 ml L-Glutamin; # 25030-024; Gibco

2.13 *In vitro*-Phagozytose-Assay

AMΦ wurden, wie oben unter 2.3.2 beschrieben, isoliert. Ein Teil der AMΦ-Kultur wurde nach 45-minütiger Kultivierung und Abnahme des Kulturüberstandes 15 Minuten mit 25 ng/ml PMA (entspricht 40,5 nM; Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) in RPMI bei 37°C und 5 % CO_2 überschichtet. Zur Koinkubation mit den zu phagozytierenden Substanzen wurde der Überstand der AMΦ-Kulturen abgenommen und verworfen und direkt anschließend mit den in RPMI+10 % FCS gelösten zu phagozytierenden Materialien überschichtet.

Die AMΦ wurden mit apoptotischen AT2-Zellen im Verhältnis AMΦ:AT2 1:8, mit apoptotischen PMN im Verhältnis AMΦ:PMN von 1:5 oder opsonierten FITC-gelabelten Latexpartikeln im Verhältnis AMΦ:Latexpartikel von 1:10 in RPMI + 10 % FCS für 1,5 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 in den gekammerten Objektträgern (NUNC, Roskilde, Dänemark) kultiviert. Der Kulturüberstand wurde abgenommen, bei 530 ×g und 4°C 5 Minuten zentrifugiert und dessen Überstand bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren (Multiplex-Assay). Der Zellrasen wurde zweimal kräftig mit HBSS gewaschen und anschließend durch 20-minütiges Überschichten mit 4 % Formaldehyd (Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande) fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS und Entfernen der Kammern wurden die Objektträger im Dunkeln getrocknet und bis zur mikroskopischen Auswertung aufbewahrt.

Die fixierten Präparate des Phagozytose-Assays wurden am Axio Imager M1 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet. Die AMΦ wurden in zehn stichprobenartig ausgesuchten Feldern auf dem Objektträger bei 400-facher Vergrößerung geblindet ausgezählt. Der prozentuale Anteil der phagozytierenden AMΦ wurde berechnet.

Verwendete Puffer und Lösungen:

PMA (Phorbol 12-myristat 13-Acetat)	40,5 nM, # P 8139 ; Sigma
RPMI Medium 1640	# E15-840; PAA

+ 10 % FCS	+ 55 ml hitzeinaktiviertes FCS; # S 0115; Biochrom KG + 10 ml Nicht-essentielle Aminosäuren; # 11140-035; Gibco + 10 ml Penicillin/ Streptomycin; # 15140-122; Gibco + 10 ml L-Glutamin; # 25030-024; Gibco
4 % Formaldehyd	Formaldehyd (37%ige Lösung); # F15587; Sigma-Aldrich
HBSS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+})	# 14025 ; Gibco

2.14 *In vivo*-Phagozytose-Assay

Bei männlichen CD-Ratten wurde, wie unter 2.2 beschrieben, ein Thoraxtrauma induziert bzw. eine Kontrollbehandlung durchgeführt. Zwei und 24 Stunden nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma wurden jeweils 1 ml FITC-gelabelte Latexpartikel in einer Konzentration von 1×10^8/ml in DPBS intratracheal instilliert. 2,5 Stunden nach der Instillation wurde eine bronchoalveoläre Lavage (siehe 2.3.2) durchgeführt. Die absolute Anzahl an AMΦ und die Zahl der AMΦ mit aufgenommenen Latexpartikeln wurden am Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II getrennt erfasst und mit der FACSDiva™-Software (BD) die Prozentzahl an phagozytierenden Zellen berechnet.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Fluoresbrite ^{TM} Carboxylate 0.75	# 07766-10; Micron Microspheres, Polysciences
DPBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+}	# 14190-094; Gibco

2.15 Bestimmung der Chemokinkonzentrationen im Kulturüberstand und in der bronchoalveolären Lavage

Die Konzentrationen von TNF-α, IL-1β, MIP-1α, GRO-KC, MCP-1 und RANTES des AMΦ–Kulturüberstands wurden nach Herstellerangaben mit dem Milliplex Rat Cytokine/Chemokine Immunoassay (Millipore Corporation, Billerica, USA) bestimmt. Hierbei können bis zu 100 Chemokine bzw. Zytokine in einer Probe bestimmt werden. Grundlage der Methode sind Beads, die durch zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe markiert sind. Durch die Kombination von unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Farbstoffe werden Beads unterschiedlicher Fluoreszenz hergestellt. An diesen Beads sind spezifische Antikörper gebunden, sodass an ihnen die zu ermittelnde Zytokine binden können, die wiederum durch einen Streptavidin-PE-konjugierten Detektions-Antikörper markiert werden. Über einen ersten Laser wird die Eigenfluoreszenz des Beads und somit die Art des Zytokins gemessen. Durch einen zweiten Laser kann dann die Fluoreszenz des Detektions-Antikörpers und damit die Menge des Zytokins in der vorliegenden Flüssigkeit ermittelt werden. Die Messung wurde am Bio-Plex 200 System der Firma Biorad durchgeführt.

2.16 Proteinanalysen

Der Nachweis von Surfactant-Protein-A und -D in der BAL erfolgte mittels Western-Blot. Die BAL wurde, wie unter 2.3.2 beschrieben, gewonnen und deren Proteingehalt mit dem BCA-Test (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, USA) bestimmt.

2.16.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die gesuchte Proteinkonzentration zu ermitteln, wurde als Standard in destilliertem Wasser gelöstes bovines Serumalbumin (BSA) genutzt. Hierzu wurde nach Herstellerangaben folgende BSA-Konzentrationen mitgeführt: 1, 0,7, 0,5, 0,3, 0,1 und 0 mg/ml. Jeweils 10 µl der BAL wurden 1:4 mit 30 µl H_2O verdünnt. In eine 96er Mikrotiterplatte wurden je Well 10 µl der zu bestimmenden verdünnten Probe oder des BSA-Standard pipettiert, wobei jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Reagenz A und Reagenz B des Pierce Protein Assays wurden 50:1 gemischt. Anschließend wurden jeweils 200 µl davon zu den Proben hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die Absorption bei 562 nm am Spektralphotometer gemessen. Zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen der BAL wurde anhand der Messwerte des BSA-Standards eine Standardkurve erstellt, mittels derer die unbekannten Konzentrationen der Proteine direkt proportional bestimmt werden konnten.

2.16.2 Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel

Die Trennung einzelner Proteine erfolgte nach ihrem Molekulargewicht in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Gel). Dazu wurden 5 µg Protein in 40 µl destilliertem Wasser mit 15 µl Sample Puffer gemischt, kurz anzentrifugiert und 7 Minuten bei 96°C gekocht. Die Proben wurden dann auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde ein High Rainbow-Marker (Amersham High-range rainbow molecular weight marker, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) als Molekulargewichtstandard verwendet.

Das Gel setzte sich aus einem 5 %igem Sammelgel und einem sich anschließenden 12,5 %igen Trenngel für SP-A (26-35 kDa) bzw. einem 10 %igen Trenngel für SP-D (43 kDa) zusammen. Für die Auftrennung der Proteine wurde eine Spannung von 250 V angelegt. Anschließend an die Elektrophorese erfolgte die Weiterverarbeitung des Gels im Western-Blot (siehe 2.16.3).

Verwendete Puffer und Lösungen:

Sample Buffer	9,5 g Laemmli Sample Buffer; # 161-0737; Bio Rad 0,5 ml 2-Mercaptoethanol; # M3148; Sigma Lagerung bei 4°C
Upper Buffer	6,05 g Tris; # 77-86-1; USB Corporation 0,4 g SDS; # 71729, Sigma + 300 ml ddH_2O; pH mit 10 M HCl auf 6,8 eingestellt; Aufgefüllt mit ddH_2O auf 100 ml; Lagerung bei 4°C
Lower Buffer	91 g Tris 0,4 g SDS + 300 ml ddH_2O; pH mit 10 M HCl auf 8,8 eingestellt; Aufgefüllt mit ddH_2O auf 500 ml; Lagerung bei 4°C
Trenngel	4,2 ml (SP-A) bzw. 3,3 ml (SP-D) 30% Acryl Rotiphorese 2,5 ml Lower Buffer + 3,3 (SP-A) ml bzw. 4,2 ml (SP-D) ddH_2O

	+ 30µl 25 % APS; # 3678; Sigma
	gemischt
	+ 10µl TEMED; # T9281; Sigma
	gemischt + Gel gegossen
Sammelgel	1,6 ml 30 % Acryl Rotiphorese; #3029.1; Roth
	2,5 ml Upper Buffer
	+ 5,9 ml ddH_2O; + 40 µl 25 % APS
	gemischt
	+ 20 µl TEMED
	gemischt + Gel gegossen

2.16.3 Semi-Dry-Western Blot

Der Western Blot dient der Identifizierung und der semiquantitativen Auswertung der aufgetrennten Proteine.

Die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen (Porengröße 0,45µm, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK) transferiert. Dafür wurde das Gel nach der Elektrophorese in den Transferpuffer gelegt und ein in Transferpuffer getränktes Whattmanpapier auf die Anode gelegt. Nach Abtrennen des Sammelgels wurde das Gel auf die Nitrocellulosemembran auf dem Whattmanpapier gelegt, mit einem weiteren in Transferpuffer getränkten Whattmanpapier bedeckt und vorsichtig die Kathode aufgelegt. Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei einer Stromstärke von 0,18 A über 2 Stunden. Die Nitrozellulosemembran wurde daraufhin 1 Stunde bei RT in TBST-Puffer (5 % Milchpulver) inkubiert, um freie Proteinbindestellen abzublocken. Zur Detektion der Proteine wurden die Membranen mit den spezifischen Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Die SP-A-Antikörper (Millipore Corporation, Billerica, USA) wurden hierfür 1:250 und die SP-D-Antikörper (Millipore Corporation, Billerica, USA) 1:500 mit TBST-Puffer (5 % Milchpulver) verdünnt. Nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer wurden die Membranen mit dem 1:1500 in TBST-Puffer verdünnten Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-konjugierter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper für SP-A bzw. Meerrettichperoxidase-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper für SP-D (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA)) 1 Stunde bei RT unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Membranen wurden 4 mal in TBST-Puffer gewaschen. Zur

Visualisierung der positiven Banden wurde der Chemilumineszenz-Detektions-Kit Chemi Glow (Alpha Innotech, San Leandro, USA) verwendet. Nach Mischen der beiden Komponenten des Kits im Verhältnis 1:1 wurde eine Membran in einem Milliliter des Gemisches inkubiert. Es folgte die Belichtung eines Röntgenfilms in einer Dunkelkammer durch Inkubation mit der Membran für 5-15 Sekunden. Der Röntgenfilm wurde mit einer Compact 2 Röntgenfilmentwicklungsmaschine (Hohmann Röntgentechnik GmbH&Co KG, Hannover, Deutschland) entwickelt.

Als Kontrolle für die Proteinbeladung der Membranen wurden diese im Reblot-Verfahren mit polyklonalem Kaninchen-Anti-β-Aktin-Antikörper (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST-Puffer inkubiert. Als Zweitantikörper wurde einen Meerrettichperoxidase-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology) verwendet. Die Detektion erfolgte wieder mit dem Chemilumineszenz-Detektions-Kit Chemi Glow.

Die Blots wurden eingescannt und die Intensität bzw. die Farbdichte der einzelnen Banden bzw. mit der Software ImageJ software (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, USA) densitometrisch berechnet. Die Werte wurden auf β-Aktin als Ladekontrolle normalisiert und statistisch ausgewertet.

Verwendete Puffer, Lösungen und Antikörper:

Transferpuffer	2,93 g Glycerol; # G-8773; Sigma
	5,81 g Tris
	0,375 g SDS
	200 ml Methanol; # 32213; Sigma-Aldrich
	Aufgefüllt mit ddH_2O auf 1 l; Lagerung bei Raumtemperatur
10*TBS	24,1 g Tris Base/Trizma Base; # T6066; Sigma
	80 g NaCl
	Aufgefüllt mit ddH_2O auf 1 l
	pH mit 10 M HCl auf 7,6 einstellen
	Lagerung bei 4°C
10 % Tween	10 ml Tween 20*; # P1379; Sigma
	90 ml ddH_2O

	Lagerung bei 4°C
TBST-Puffer	100 ml 10*TBS
	900 ml ddH_2O
	10 ml 10 % Tween
	Lagerung bei 4°C
Milchpulver	# T145.2; Roth
Chemi Glow	# 60-12596-00; Alpha Innotech

Primärantikörper:

Anti-Surfactant Protein A	# AB 3420; Millipore
Anti-Surfactant Protein D	# MAB 3132; Millipore
Anti-β-Aktin	# 4970; CellSignaling

Sekundärantikörper:

Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	# 7074; CellSignaling
Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody	# 7076; CellSignaling

2.17 Bestimmung des löslicher Fas-Ligand (ELISA)

Der Nachweis von löslichem Fas-Ligand in der BAL erfolgte mittels indirektem ELISA. Die Proben wurden zunächst 1:200 mit Coating Buffer (20 mM Tris-HCL pH 8,5) verdünnt. Als Standardprotein wurde rekombinanter Fas-Ligand der Ratte (0,05 mg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet. Ausgehend von einer Konzentration von 15000 pg/ml wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. 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 der Überstand 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 Abblocken unspezifischer Bindungen hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei 37°C wurde 4-mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,5 + 0,05 % Tween 20) gewaschen, 50 µl/Well des Erstantikörpers (Anti-Ratte Fas-Ligand/TNFSF6 Antibody, R&D Systems) hinzupipettiert und danach 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem 4-maligem Waschen mit 300 µl Waschpuffer

wurde für 1 Stunde 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 Waschpuffer gewaschen. Anschließend folgte eine 1-stündige Inkubationsphase mit 50 µl Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (Jackson ImmunoResearch). Einem weiteren Waschschritt folgend wurde in jedes Well 50 µl Tetramethylbenzidin (TMB) Reagenz (TMB Substrate Reagent Set, Pharmingen) pipettiert und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Um die Farbentwicklung zu stoppen, wurde abschließend 50 µl/Well Stopplösung (2 N Schwefelsäure, Sigma-Aldrich) zugefügt und die Absorption bei 450 nm (Referenzfilter 570 nm) am Microplate-Reader (Tecan sunrise, Crailsheim) photometrisch gemessen. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der aus den Standards berechneten Standardgeraden direkt proportional ermittelt.

Verwendete Puffer und Antikörper:

Coating Buffer	2,42 g Tris; # 77-86-1; USB Corporation gelöst in 1 l ddH_2O pH mit 10 M HCl auf 8,5 einstellen
Washing-Buffer	0,5 ml Tween 20 gelöst in1 l Coating Buffer
Blocking Buffer	3 g BSA; # A8022; Sigma gelost in 1 l Washing Buffer
Dilution Buffer	1 g BSA; # A8022; Sigma gelöst in 1 l Washing Buffer

<u>Antikörper:</u>

Anti-rat Fas Ligand/TNFSF6 Antibody	# AF1858; R&D
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Anti Goat IgG	# 305-065-045; JacksonImmunoResearch
Peroxidase-conjugated Streptavidin	# 016-030-084; JacksonImmunoResearch

2.18 Statistik

Zur Ermittlung der Unterschiede wurden die Daten nach Ermittlung der Normalverteilung mittels der Varianzanalysen ONE-Way-ANOVA und TWO-Way-ANOVA getestet. Der ONE-Way-ANOVA wurde als einfaktorielle Varianzanalyse zum Vergleich der Varianz der Mittelwerte mehrerer Gruppen mit einer unabhängigen Variablen genutzt (3.1, 3.2.1, 3.2.6-3.2.9). Waren die Daten nicht normalverteilt, wurde ein ANOVA on Ranks durchgeführt. Der TWO-Way-ANOVA-Test wurde eingesetzt, wenn durch das Auftreten einer weiteren unabhängigen Variablen eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt werden musste (3.2.3-3.2.5, 3.2.10 und 3.2.11). Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem posthoc Test nach Student Newman Keuls überprüft. Ab einem Signifikanzwert von $p<0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant erachtet. Die Ergebnisse wurden in den Diagrammen als Mittelwerte ± Standardfehler (als Fehlerbalken) angegeben. Für die statistischen Berechnungen wurde das Computerprogramm SigmaStat Version 2.0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Deutschland) verwendet. Alle Diagramme wurden mit SigmaPlot 2001 (SPSS Science Software, GmbH Erkrath, Deutschland) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von Fas/FasL nach stumpfem Thoraxtrauma

Die Verletzung durch ein stumpfes Thoraxtrauma induziert sowohl lokal im Lungengewebe, als auch systemisch funktionelle und strukturelle Veränderungen, deren Folgen von der Ausbildung von Ödemen im Alveolarraum und entsprechend eingeschränktem Gasaustausch bis hin zur Ausbildung eines respiratorischen Versagens reichen können. Wie in vorangegangenen Studien nachgewiesen werden konnte, kommt es durch ein Thoraxtrauma zur Abnahme intakter Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen). Dabei führt eine gesteigerte Apoptoseaktivität zur Reduktion dieser Zellen, deren primäre Aufgabe die Herstellung des die Oberflächenspannung herabsetzenden Surfactant ist [178]. Parallel dazu steigt der Gehalt an löslichem Fas-Ligand (sFasL) in der bronchoalveolären Lavage (BAL) kontinuierlich über 48 Stunden nach einem stumpfen Thoraxtrauma an [178].
Um die Quelle und die inflammatorischen Auswirkungen von sFasL in der Lunge zu analysieren, wurden isolierte Alveolarmakrophagen (AMΦ) und AT2-Zellen sowie deren Kulturüberstände untersucht.

3.1.1 Nachweis von löslichem Fas-Ligand (sFasL) in Alveolarmakrophagen (AMΦ)-Kulturüberständen

Um den Beitrag der AMΦ an den in der BAL nachgewiesenen erhöhten Konzentrationen von FasL nach Thoraxtrauma zu bestimmen, wurden diese 6, 24 und 48 Stunden nach Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung isoliert und 24 Stunden kultiviert. In den Kulturüberständen der AMΦ wurde der lösliche FasL (sFasL) mittels ELISA bestimmt. Die Konzentration an sFasL im Kulturüberstand der AMΦ, die 6 Stunden nach Thoraxtrauma isoliert wurden, war doppelt so hoch wie die sFasL-Konzentration in der entsprechenden Kontrollgruppe (Abb. 6). 24 Stunden nach Thoraxtrauma war der durch das Thoraxtrauma hervorgerufene Effekt bereits abgeschwächt und es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Thoraxtrauma und Kontrollgruppe mehr festgestellt werden. In Überständen von AMΦ-Kulturen, die 48 Stunden nach Thoraxtrauma angelegt wurden, konnte dagegen bereits eine Tendenz zu niedrigeren sFasL-Konzentrationen gegenüber denen aus Kontrolltieren nachgewiesen werden.

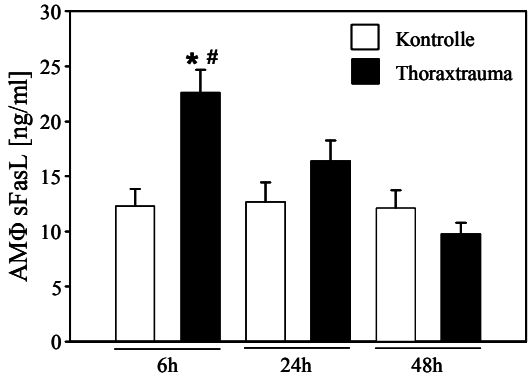

Abb. 6 Konzentrationen von löslichem Fas-Ligand (sFasL) in Alveolarmakrophagen (AMΦ)-Kulturüberstanden

Die AMΦ wurden 6, 24 und 48 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma an männlichen CD-Ratten mittels bronchoalveolärer Lavage entnommen und 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 mit DMEM + 0.5 % fetalem Kälberserum (LifeTechnologies, Rockville, USA) kultiviert. Die Bestimmung von sFasL im Kulturüberstand wurden nach Herstellerangaben einem Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, USA) durchgeführt. Mittelwert ± Standardfehler von n=13-14 Ratten pro Gruppe; *$p<0,05$ vs. zugehörigem Kontrollzeitpunkt , #$p<0,05$ vs. 48 h Thoraxtrauma (ANOVA)

3.1.2 Apoptose-Induktion durch löslichen Fas-Ligand (sFasL) in Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) bzw. Alveolarmakrophagen (AMΦ)

Die Effizienz der Apoptose-Induktion in AT2-Zellen durch humanen rekombinanten löslichen Fas-Ligand (Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA) wurde durch die Kultivierung von AT2-Zellen aus unbehandelten Ratten in DMEM + 0,5 % fetalem Kälberserum (LifeTechnologies, Rockville, USA) mit Zusatz von löslichem Fas-Ligand in den Konzentrationen 0 ng/ml, 50 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml untersucht. Bereits bei einer Konzentration von 50 ng/ml kam es zu einer signifikanten Zunahme der apoptotischen AT2-Zellen. Bei einer Konzentration von 500 ng/ml verdoppelte sich die Zahl an apoptotischen AT2-Zellen im Vergleich zur Anzahl der apoptotischen AT2-Zellen nach Kultivierung mit reinem Medium (Abb. 7).

Im Unterschied dazu konnte nach der Kultivierung von AMΦ aus unbehandelten Ratten in DMEM + 0,5 % fetalem Kälberserum mit den oben genannten Konzentrationen von löslichem Fas-Ligand keine Apoptose induzierende Wirkung des rekombinanten löslichen Fas-Ligand nachgewiesen werden (Abb. 8).

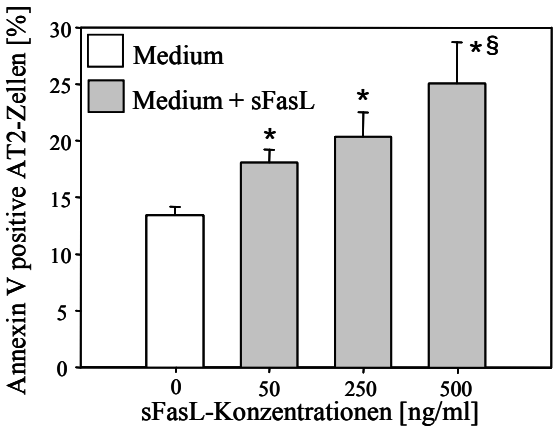

Abb. 7 Apoptose-Induktion durch löslichen Fas-Ligand (sFasL) in Alveolar Typ 2 (AT2)-Zellen
AT2-Zellen wurden aus unbehandelten männlichen CD-Ratten isoliert. Sie wurden in den Konzentrationen 0, 50, 250 und 500 ng/ml mit humanem rekombinanten löslichen Fas-Ligand (Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA) in DMEM + 0,5 % fetalem Kälberserum (LifeTechnologies, Rockville, USA) kultiviert. Nach 18-stündiger Kultivierung bei 37°C und 5 % CO_2 auf gekammerten Objektträgern und Fixierung wurden die AT2-Zellen mit Annexin V (Hölzel Diagnostika, Köln) gefärbt. 3 Gesichtsfelder wurden bei 200-facher Vergrößerung nach Annexin V-positiven und Annexin V-negativen AT2-Zellen ausgezählt (Axio Imager M1, Zeiss, Oberkochen) und der Prozentsatz berechnet. Mittelwert ± Standardfehler von n=9 Ratten pro Gruppe. * $p<0,05$ vs. Medium , § $p<0,05$ vs. 50 ng/ml sFasL (ANOVA)

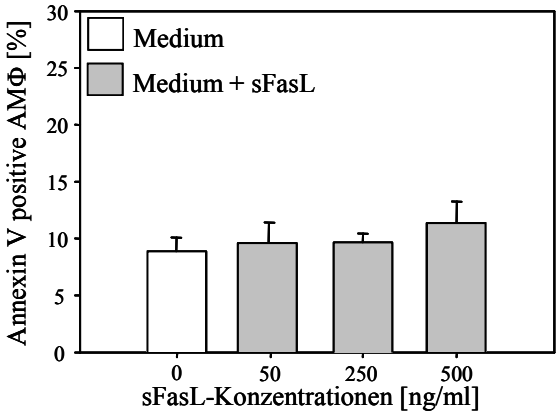

Abb. 8 Apoptose-Induktion durch löslichen Fas-Ligand (sFasL) in Alveolarmakrophagen (AMΦ)
AMΦ wurden aus unbehandelten männlichen CD-Ratten isoliert. Sie wurden in den Konzentrationen 0, 50, 250 und 500 ng/ml mit humanem rekombinanten löslichen Fas-Ligand (Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA) in DMEM + 0,5 % fetalem Kälberserum (LifeTechnologies, Rockville, USA) kultiviert. Nach 18-stündiger Kultivierung in 35 mm-Petrischalen bei 37 °C und 5 % CO_2 wurden die AMΦ durch Zugabe von Trypsin-EDTA (30 sec. bei 37°C / 5 % CO_2 und 1 min. auf Eis) abgelöst und mit ANNEXIN V-FITC/7-AAD KIT (Beckman Coulter, Fullerton, USA) gefärbt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch am BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson and Company, Heidelberg, Germany) mit der FACS Diva™-Software (BD). Mittelwert ± Standardfehler von n=4 Ratten pro Gruppe. (ANOVA)

3.1.3 Mediatorenfreisetzung in Alveolarmakrophagen (AMΦ)- oder Alveolar-Typ 2 Epithelzell (AT2-Zell) -Kulturen mit und ohne Stimulation durch löslichen Fas-Ligand (sFasL)

Da es nach Thoraxtrauma in der bronchoalveolären Lavage und in den Kulturüberständen der Alveolarmakrophagen (AMΦ) zu einem Anstieg der Konzentrationen von löslichem Fas-Ligand (sFasL) kommt, sollten die immunologischen Reaktionen höherer Konzentrationen von sFasL auf AMΦ und AT2-Zellen ermittelt werden. Dazu wurden AMΦ und AT2-Zellen 24 Stunden nach Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung isoliert und wie unter 2.6 beschrieben mit 500 ng/ml sFasL inkubiert. Diese Konzentration führt, wie unter 3.1.2 beschrieben, zur Verdopplung der Anzahl apoptotischer AT2-Zellen, jedoch zu keiner Veränderung der Zahl an apoptotischen Alveolarmakrophagen.

In den AMΦ-Kulturüberständen aus traumatisierten Tieren konnte ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen von IL-6, IL-10 und MCP-1 gegenüber den AMΦ-Kulturüberständen aus den korrespondierenden Kontrolltieren festgestellt werden (Abb. 9 A1-A3). Die zusätzliche Stimulation der AMΦ-Kulturen aus traumatisierten Tieren mit löslichem Fas-Ligand führte zu einer Verdopplung der IL-6-Konzentrationen im Kulturüberstand (Abb. 9 A1). Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass eine zusätzliche Stimulation der AMΦ aus traumatisierten Tieren mit löslichem Fas-Ligand zu einer um ca. 50 % reduzierte Sekretion des anti-inflammatorischen IL-10 durch die AMΦ nach Thoraxtrauma führt (Abb. 9 A2). Durch Stimulation mit löslichem Fas-Ligand wurde keine Veränderung in der Abgabe von MCP-1 durch AMΦ hervorgerufen. In AT2-Zellkulturüberständen aus Traumatieren konnten signifikant höhere Konzentrationen an IL-6, IL-10 und MCP-1 als in AT2-Zellkulturüberständen aus Kontrolltieren nachgewiesen werden. Bei dieser Zellpopulation konnten weder bei den Kontrollen noch bei den AT2-Zellen aus Traumatieren eine Veränderung der Mediatorenfreisetzung durch die zusätzliche Stimulation mit löslichen Fas-Ligand beobachtet werden (Abb. 9 B1-3).

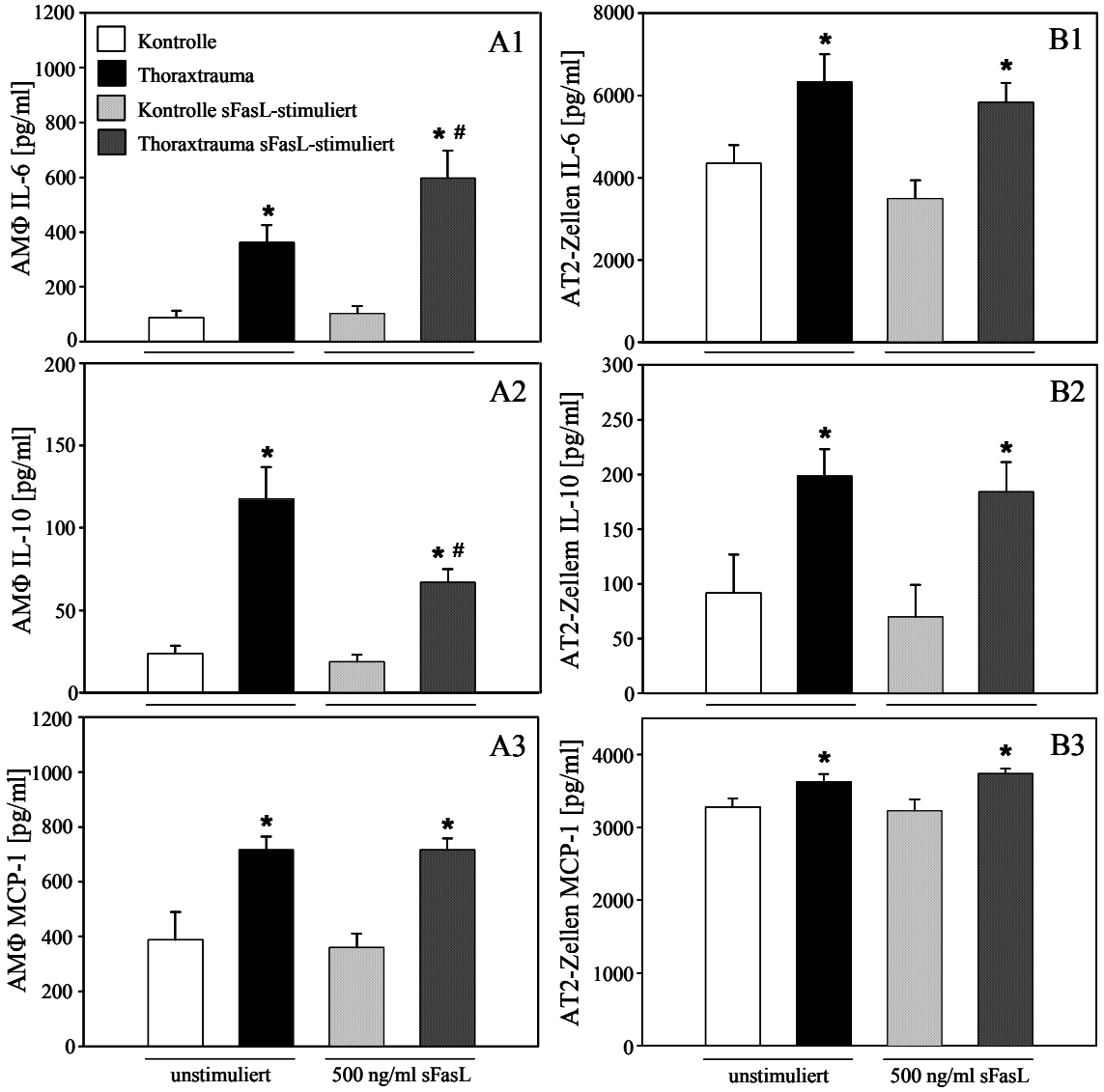

Abb. 9 Zytokinkonzentrationen in (A) Alveolarmakrophagen (AMΦ)-Kulturüberständen und (B) Alveolar Typ 2 (AT2)-Zell-Kulturüberständen mit und ohne Stimulation durch löslichen Fas-Ligand (sFasL; 500 ng/ml)

Die AMΦ (A1-3) wurden 24 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma entnommen und 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 in DMEM + 0.5 % fetalem Kälberserum (LifeTechnologies, Rockville, USA) mit und ohne Stimulation durch löslichen Fas-Ligand (sFasL; 500 ng/ml) kultiviert. Die Konzentrationen von IL-6 (A1) (n=8-11), IL-10 (A2) (n=9-11) und MCP-1 (A3) (n=5-11) in den AMΦ–Kulturüberständen wurden mittels ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) bestimmt.

Die AT2-Zellen (B1-3) wurden ebenfalls 24 Stunden nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma entnommen und 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 mit DMEM + 0.5 % fetalem Kälberserum (LifeTechnologies, Rockville, USA) mit und ohne Stimulation durch löslichen Fas-Ligand (sFasL; 500 ng/ml) kultiviert. Die Konzentrationen von IL-6 (B2) (n=6-9), IL-10 (B2) (n=8-11) und MCP-1 (B3) (n=8-11) in AT2-Zellen-Kulturüberständen mittels ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) bestimmt. Mittelwert ± Standardfehler *$p<0,05$ vs. zugehörige Kontrolle, #$p<0,05$ vs. unstimuliertes Thoraxtrauma (ANOVA)

3.1.4 Durchflusszytometrische Bestimmung von Fas- und FasL-Protein auf Alveolarmakrophagen (AMΦ)- und Alveolar-Typ 2 Epithelzell (AT2–Zell) - Oberfläche

Wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt, kommt es nach Thoraxtrauma zu verstärkter Abgabe des pro-inflammatorischen IL-6 und des anti-inflammatorischen IL-10 der AMΦ in deren Kulturüberstand. Durch die Stimulation mit sFasL lässt sich eine zusätzliche Erhöhung der IL-6-Konzentration beobachten, wohingegen der Anteil an anti-inflammatorischem IL-10 durch sFasL gesenkt wird. Dagegen hat die Stimulation mit sFasL auf die Abgabe von Zytokinen durch isolierte AT2-Zellen keine Auswirkung.

Daher sollte überprüft werden, ob die Aktivierung der AMΦ auf einen regulatorischen Effekt des Thoraxtraumas auf die Expressionstärke von Fas zurückzuführen ist. Auch auf die Oberfläche der AT2-Zellen wurde die Expressionstärke dieses mit sFasL interagierenden Rezeptors untersucht.

Der Fas-Rezeptor konnte konstitutiv auf fast 100 Prozent der AMΦ nachgewiesen werden. 4 Stunden nach Thoraxtrauma konnte nur noch auf der Oberfläche von ca. 80 Prozent der AMΦ Fas-Protein festgestellt werden (Abb. 10 A1). Nach 16 Stunden war der Anteil an Fas-positiven AMΦ weiter auf ca. 50 Prozent abgefallen. Rund 50 Prozent der AT2-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Fas. Das Thoraxtrauma hatte zu keinem Zeitpunkt einen regulierenden Einfluss auf die Fas-Expression auf der AT2-Zell-Oberfläche (Abb. 10 B1).

Löslicher Fas-Ligand entsteht nach Abspaltung des zellgebundenen Fas-Liganden durch Metalloproteinasen. Um die Quelle der unter 3.1.1 im Kulturüberstand von AMΦ und in der BAL nachgewiesenen und durch ein Thoraxtrauma verstärkt freigesetzten sFasL-Molekülen zu ermitteln, wurde die FasL-Expression auf den Zelloberflächen von AMΦ und AT2-Zellen ermittelt.

Auf den AMΦ konnte 4 Stunden nach Thoraxtrauma eine Reduktion des FasL etwa um den Faktor 3 auf ca. 15 Prozent der AMΦ beobachtet werden. Nach 16 Stunden war der Anteil an FasL-positiven AMΦ bereits wieder bei über 60 Prozent (Abb. 10 A2). Weder zwischen den AT2-Zellen aus den Traumatieren und den Kontrolltieren, noch zwischen den beiden Zeitpunkten konnten signifikante Unterschiede der FasL-Expression auf den AT2-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 10 B2).

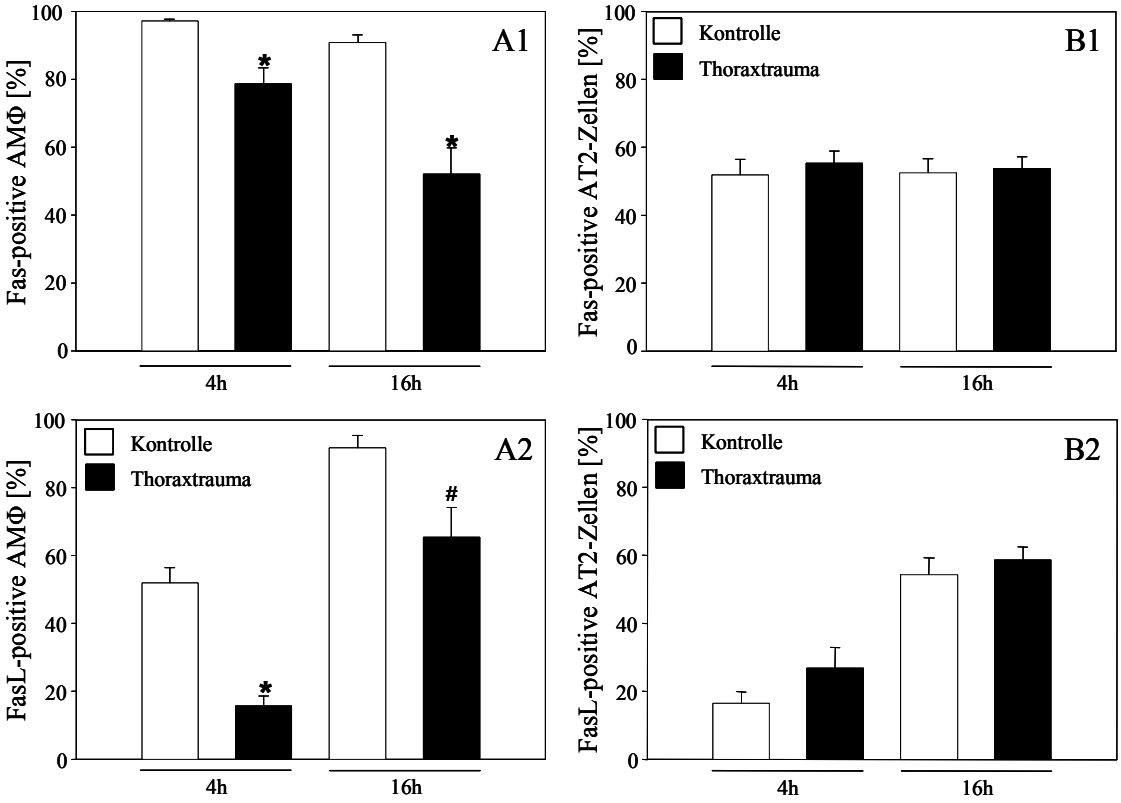

Abb. 10 Analyse der Proteinexpressionsänderung von Fas und FasL auf Alveolarmakrophagen (AMΦ) und Alveolar Typ 2 (AT2)-Zellen nach Thoraxtrauma

Die AMΦ (A) und AT2-Zellen (B) wurden 4 und 16 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert und die Expression von Fas (A1+B1) oder Fas-Ligand (FasL) (A2+B2) auf der Oberfläche der Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Mittelwert ± Standardfehler des prozentuellen Anteils positiver Zellen von n=10 Ratten pro Gruppe. *$p<0,05$ vs. zugehörige Kontrolle, $^{\#}p<0,05$ vs. Thoraxtrauma 4 h (ANOVA)

3.1.5 Expression von Fas und FasL-mRNA in Alveolarmakrophagen (AMΦ) und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen)

Die durch ein Thoraxtrauma hervorgerufene Reduktion von Fas und FasL auf der Oberfläche der AMΦ und die Stagnation der Fas- und FasL-Protein-Expression auf den AT2-Zellen sollte nun auf RNA-Ebene verifiziert werden. Dazu wurden die Fas- und FasL-mRNA-Expressionen der AMΦ und AT2-Zellen mittels qRT-PCR ermittelt.

In AMΦ, die 4 Stunden nach Thoraxtrauma isoliert wurden, konnte eine signifikant niedrigere Fas-mRNA-Expression nachgewiesen werden, als in AMΦ aus Kontrolltieren und in AMΦ, die 16 Stunden nach Thoraxtrauma aus Tieren isoliert wurden (Abb. 11 A1). 24 Stunden nach Trauma war dagegen die Fas-mRNA in AMΦ hochreguliert. Ein signifikanter Abfall der Fas-mRNA-Expression auf die Höhe des Ausgangswertes zeigte sich in AMΦ, die 48 Stunden nach Trauma entnommen wurden (Abb. 11 A1).

Ein deutlicher Anstieg der sFasL-Konzentrationen konnte nach einem Thoraxtrauma in der bronchoalveolären Lavage und im Kulturüberstand isolierter AMΦ beobachtet werden. Die

im AMΦ-Kulturüberstand nachgewiesen erhöhten Konzentrationen von sFasL ließen auf eine erhöhte sFasL-Expression schließen. Die FasL-mRNA-Expression war in AMΦ, die nach Thoraxtrauma isoliert wurden, an allen vier untersuchten Zeitpunkten deutlich höher als in AMΦ aus Kontrolltieren (Abb. 11 A2), jedoch nur nach 4 Stunden signifikant erhöht.

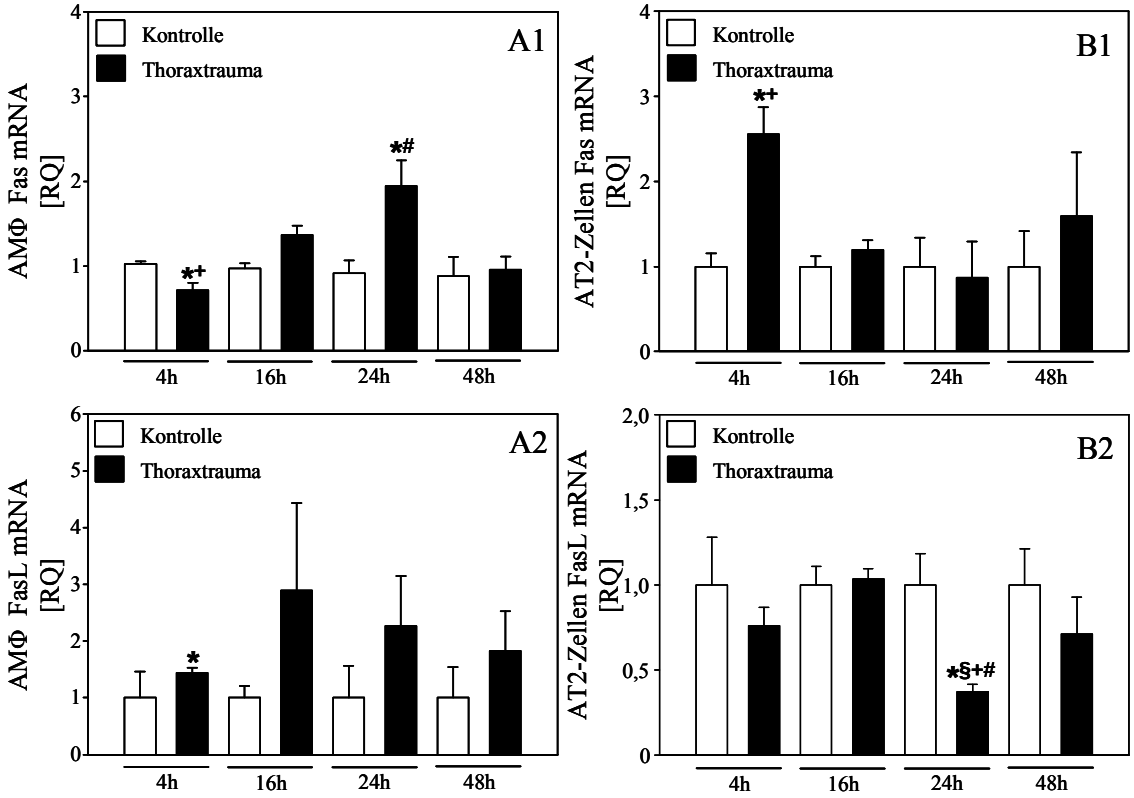

Abb. 11 Analyse der Genexpressionsänderung von Fas und FasL in Alveolarmakrophagen (AMΦ) und Alveolar Typ 2 (AT2) Zellen nach Thoraxtrauma

Die AMΦ (A1+2) und AT2-Zellen (B1+2) wurden 4, 16, 24 und 48 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert. Die RNA beider Zelltypen wurde mit dem Absolutely RNA Miniprep Kit (Stratagene, Cedar Creek, USA) nach Herstellerangaben gewonnen. Die isolierte RNA wurde mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Germany) aufgereinigt und aufkonzentriert. Nach der reversen Transkription mithilfe des AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene, Cedar Creek, USA) wurde die quantitative Real-time PCR im Mx3000P QPCR System und der entsprechenden Software (MxPro; Stratagene, Cedar Creek, USA) mithilfe des Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, Cedar Creek, USA) und QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt, die Genexpressionänderung von Fas und FasL ermittelt und die Änderung relativ quantifiziert. Mittelwert normalisiert auf β-2-Mikroglobulin ± Standardfehler von n=6-13 (A1), n=4-10 (A2), n=6-9 (B1+2) Ratten pro Gruppe. *$p<0,05$ vs. zugehöriger Kontrolle, $^{\S}p<0,05$ vs. Thoraxtrauma 4 Stunden, $^{+}p<0,05$ vs. Thoraxtrauma 16 Stunden und $^{\#}p<0,05$ vs. Thoraxtrauma 48 Stunden (ANOVA)

Wie unter 3.1.2 beschrieben, kommt es durch die Stimulation mit sFasL zu keiner zusätzlichen Aktivierung der AT2-Zellen, die nach Thoraxtrauma isoliert wurden. Auch konnte auf der AT2-Zelloberfläche keine Änderung der Fas-Protein-Expression festgestellt werden (3.1.3). Zusätzlich wurden die Fas-Expression auf RNA-Ebene auf Änderungen nach

Thoraxtrauma analysiert. In AT2-Zellen kam es 4 Stunden nach Thoraxtrauma im Vergleich zu den AT2-Zellen der Kontrolltiere zu einer signifikanten Erhöhung der Fas-mRNA-Expression. 16 Stunden nach Thoraxtrauma war diese erhöhte Expression jedoch wieder in etwa auf die Höhe des Ausgangswerts herunterreguliert (Abb. 11 B1).

Um den möglichen Beitrag der AT2-Zellen am sFasL in der BAL zu ermitteln, wurden auch von diesen die FasL-RNA-Expression ermittelt. AT2-Zellen, die 24 Stunden nach Thoraxtrauma isoliert wurden, zeigten einen signifikanten Abfall in der FasL-mRNA-Expression auf ca. ein Drittel der Werte der AT2-Zellen aus Kontrolltieren und der AT2-Zellen, die 4, 16 oder 48 Stunden nach Thoraxtrauma aus Traumatieren isoliert wurden (Abb. 11 B2).

3.2 Phagozytose- bzw. Efferozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen (AMΦ)

In vorangegangenen Studien konnte die Reduktion von intakten Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) nach dem Thoraxtrauma nachgewiesen werden. Eine gesteigerte Apoptoserate dieser für die Bildung des Surfactants essentiellen AT2-Zellen führt zu diesem Zellverlust [178]. Um eine Akkumulation apoptotischer Zellen und die Entwicklung der apoptotischen Zellen zu sekundär nekrotischen Zellen mit der damit einhergehenden Abgabe pro-inflammatorischer Mediatoren zu verhindern, müssen die apoptotischen Zellen möglichst schnell durch phagozytierende Zellen, wie Alveolarmakrophagen, beseitigt werden. Hieraus ergibt sich die Frage, ob der großen Anzahl an apoptotischen Zellen im bronchoalveolären Kompartiment nach Thoraxtrauma mit einer verstärkten Phagozytose- bzw. Efferozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen begegnet wird.

3.2.1 Zahl der neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage (BAL) nach Thoraxtrauma

Die Entzündungsreaktion, die durch ein Thoraxtrauma induziert wird, hat die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut in den bronchoalveolären Raum zu Folge. Die Anzahl an eingewanderten PMN wurde 6, 24 und 48 Stunden nach Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung in der BAL ermittelt. Wie in Abb. 12 zu sehen ist, konnte bereits

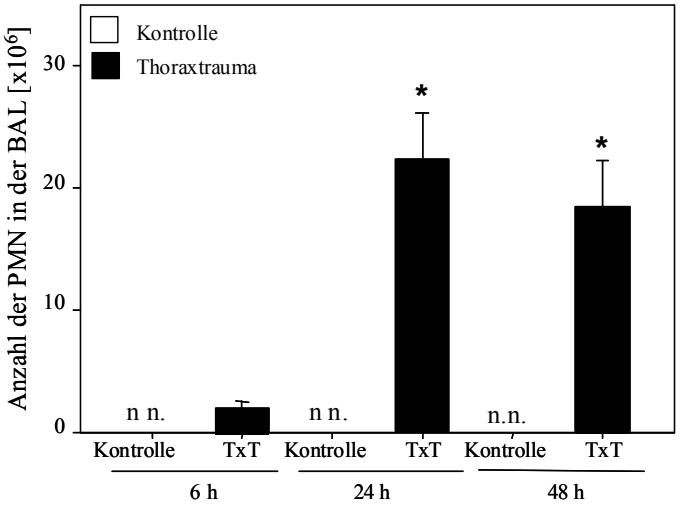

Abb. 12 Anzahl an neutrophilen Granulozyten (PMN) in der bronchoalveolären Lavage (BAL)
Aus männlichen CD-Ratten wurden 6 , 24 und 48 Stunden (h) nach Thoraxtrauma (TxT) bzw. Kontrollbehandlung (Kontrolle) eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt und die Zahl der neutrophilen Granulozyten nach Färbung mit Kristallviolett mikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Mittelwert ± Standardfehler von n=8-14 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. Kontrollen und vs. 6 h nach Thoraxtrauma (ANOVA) (n.n. = nicht nachweisbar)

6 Stunden nach Thoraxtrauma die Einwanderung der PMN festgestellt werden. Eine Verzehnfachung der Anzahl an PMN wurde 24 Stunden nach Thoraxtrauma festgestellt. Auch 48 Stunden nach Thoraxtrauma war die Anzahl der PMN im Vergleich zur Kontrolle und den Werten 6 Stunden nach Thoraxtrauma noch signifikant erhöht. In den BAL der Kontrolltiere waren zu allen Zeitpunkten keine PMN nachweisbar.

3.2.2 Apoptose-Induktion in neutrophilen Granulozyten (PMN) und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen)

Wie unter 3.2.1 beschrieben, steigt die Zahl an kurzlebigen PMN im Alveolarraum nach Thoraxtrauma an. Auch die Zahl an apoptotischen AT2-Zellen nimmt posttraumatisch im Bronchoalveolarraum zu. Um im *in vitro*-Versuch zu ermitteln, ob es nach einem Thoraxtrauma bei Alveolarmakrophagen zu einer erhöhten Ingestionsrate dieser zwei Zelltypen kommt, wurden diese aus unbehandelten Ratten isoliert und durch UV-C-Bestrahlung Apoptose induziert.

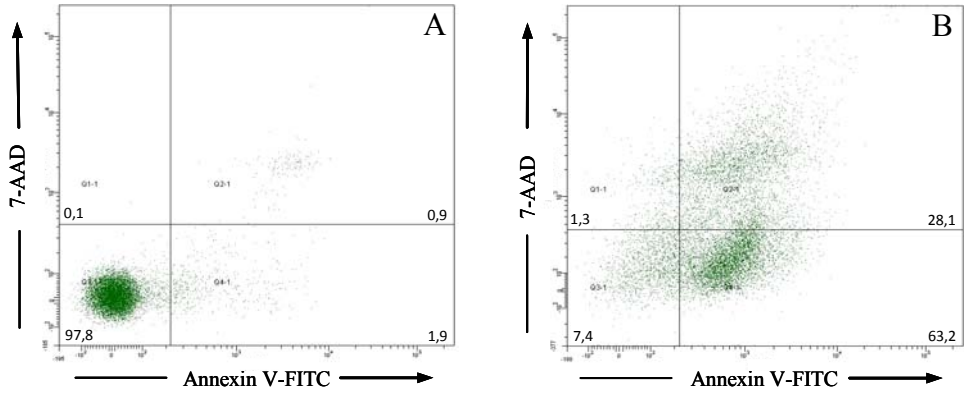

Abb. 13 Durchflusszytometrischer Apoptose-Nachweis an neutrophilen Granulozyten (PMN)
Exemplarische Darstellung von PMN, die über den Ficoll-Dichtegradienten und anschließende Dextran-Sedimentation isoliert wurden. Durch 7-minütige UV-C-Bestrahlung mit anschließender 1,5-stündiger Inkubation in HBSS+Ca^{2+}/Mg^{2+} bei 37°C und 5 % CO_2 wurde Apoptose induziert. (A) Vitale PMN ohne UV-C-Bestrahlungen. (B) Apoptotische PMN (Annexin V-positive Zellen in den beiden rechten Quadranten) nach UV-C-Bestrahlung und 1,5-stündiger Inkubation.

Zur Etablierung der Apoptose-Induktion wurden die Zellen in verschiedenen Medien den UV-C-Strahlen unterschiedlich lange ausgesetzt. Für AT2-Zellen konnte eine effiziente Apoptose-Induktion bei einer Expositionsdauer von 5 Minuten in HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+} mit darauf folgender 5-stündiger Inkubationszeit in HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+} ermittelt werden. Bei diesen Konditionen konnte die größte Menge an apoptotischen AT2-Zellen erreicht werden: 81 ± 8 % apoptotische und 8 ± 3 % nekrotische AT2-Zellen. Die höchste Apoptoserate wurde in den neutrophilen Granulozyten nach einer Expositionsdauer von 7,5 Minuten, gelöst in

HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+} und anschließender 1,5-stündiger Inkubation in HBSS Ca^{2+}/Mg^{2+} festgestellt. Unter diesen Bedingungen konnte eine Apoptoserate von ca. 96±3 % (ca.1±3 % Nekrose) erreicht werden (Beispiel in Abb. 13).

3.2.3 *In vitro*-Phagozytose- bzw. Efferozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen (AMΦ) nach Thoraxtrauma

Die mittels BAL 2 oder 24 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollbehandlung entnommenen AMΦ wurden mit den apoptotischen Zellen oder opsonierten Latexpartikeln über 90 Minuten koinkubiert. Parallel dazu wurden AMΦ ohne Zusatz als Kontrollen und der Phagozytose-Assay mit Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA) als zusätzliches Stimulans mitgeführt. Die Phagozytoserate wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt (Abb. 14-16).

Zwei Stunden nach der Induktion des Thoraxtraumas konnte eine Verdoppelung der phagozytotischen Aktivität der unstimulierten AMΦ gegenüber apoptotischen AT2-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 14a). Die Stimulation mit PMA führte zur Aufhebung des Unterschieds zwischen AMΦ aus traumatisierten Ratten und kontrollbehandelten Ratten und wird deutlich in einer Steigerung der Efferozytoseaktivität der AMΦ gegenüber apoptotischen AT2-Zellen unter PMA-Einfluß. Der Anteil an phagozytierenden AMΦ erhöhte sich bei AMΦ aus Kontrolltieren unter PMA auf das Doppelte, bei AMΦ aus traumatisierten Tieren dagegen nur um ein Drittel. Auch 24 Stunden nach der Behandlung zeigte sich durch die Stimulation mit PMA eine Verdoppelung der Phagozytoseaktivität. Jedoch konnte zwischen AMΦ aus traumatisierten Ratten und kontrollbehandelten Ratten 24 Stunden nach Behandlung kein Unterschied mehr festgestellt werden (Abb. 14a).

Bei der Aufnahme von apoptotischen neutrophilen Granulozyten konnte zwischen unstimulierten AMΦ aus Kontrolltieren und traumatisierten Tieren kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 15a). Durch die zusätzliche Stimulation mit PMA zeigte sich tendenziell eine Phagozytosesteigerung durch das Thoraxtrauma. 24 Stunden nach stumpfem Thoraxtrauma phagozytierten dabei fast dreimal soviel AMΦ apoptotische neutrophile Granulozyten, wie AMΦ aus den korrespondierenden Kontrolltieren und als unstimulierte AMΦ aus 24-Stunden-Tieren (Abb. 15a).

Eine Steigerung der Phagozytoseaktivität der AMΦ gegenüber Latexpartikeln durch ein Thoraxtrauma war sowohl mit, als auch ohne zusätzliche Stimulation mit PMA festzustellen (Abb. 16a). Jedoch war dabei keine Signifikanz nachzuweisen.

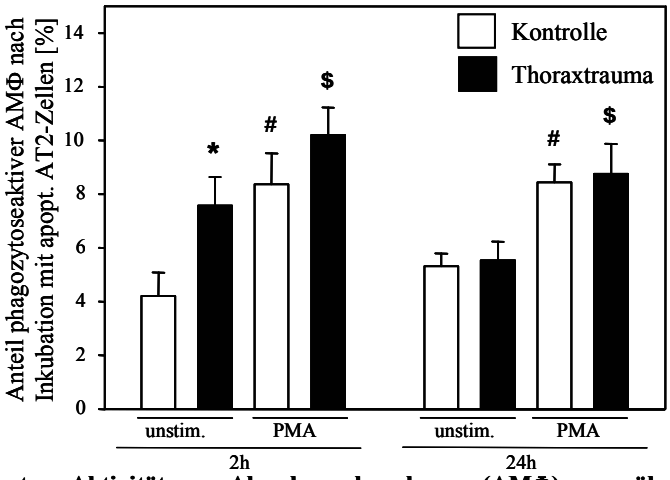

Abb. 14a Phagozytose-Aktivität von Alveolarmakrophagen (AMΦ) gegenüber apoptotischen AT2-Zellen

AMΦ wurden 2 und 24 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert und in einem Verhältnis von 1:8 90 Minuten bei 37°C / 5% CO_2 mit apoptotischen AT2-Zellen inkubiert. Die Hälfte der AMΦ-Zellkulturen wurden vor dieser Inkubation 15 Minuten mit 25 ng/ml Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) stimuliert. Die andere Hälfte blieb unstimuliert (unstim.) Die Phagozytose-Aktivität wurde fluoreszenzmikroskopisch (400-fache Vergrößerung) ermittelt. Mittelwert ± Standardfehler von n=4-9 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. zugehörige Kontrolle, #p<0,05 vs. zugehörige unstimulierte Kontrolle, $p<0,05 vs. zugehöriges unstimuliertes Thoraxtrauma (Two-Way ANOVA).

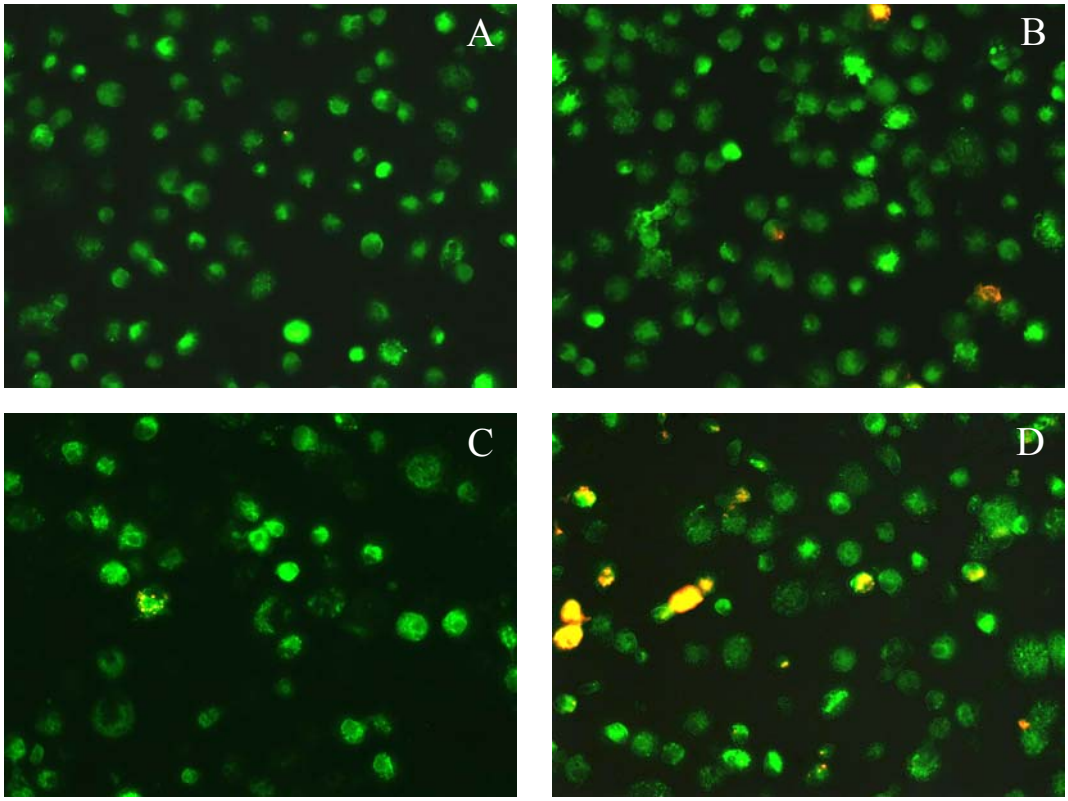

Abb. 14b Exemplarische Darstellung der Alveolarmakrophagen (AMΦ) mit phagozytierten apoptotischen AT2-Zellen

A+B: AMΦ aus Kontrolltieren 24 Stunden (B: zusätzliche Stimulation mit PMA). C+D: AMΦ aus traumatisierten Ratten 24 Stunden (D: zusätzliche Stimulation mit PMA). Die phagozytierenden AMΦ sind anhand ihrer grünen Eigenfluoreszenz erkennbar. Die phagozytierten apoptotischen AT2-Zellen setzten sich durch die gelb-orange-fluoreszierende Dioctadecyl-Tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat (DiI)-Färbung gegenüber den AMΦ ab. (400-fache Vergrößerung)

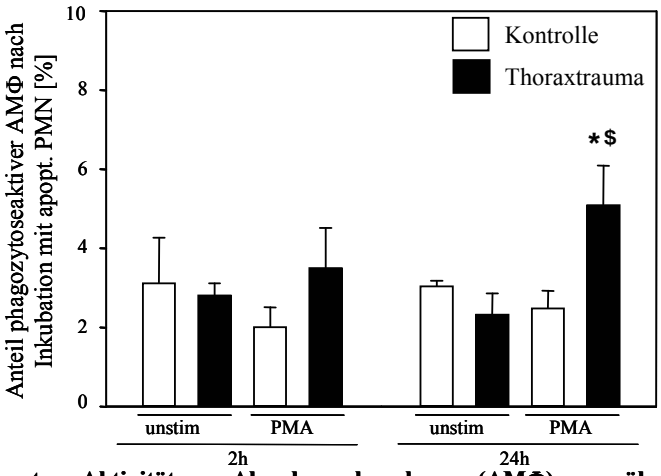

Abb. 15a Phagozytose-Aktivität von Alveolarmakrophagen (AMΦ) gegenüber apoptotischen neutrophilen Granulozyten (PMN)

AMΦ wurden 2 und 24 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert und in einem Verhältnis von 1:5 90 Minuten bei 37°C / 5% CO_2 mit apoptotischen PMN inkubiert. Die Hälfte der AMΦ-Zellkulturen wurden vor dieser Inkubation 15 Minuten mit 25 ng/ml Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) stimuliert. Die andere Hälfte blieb unstimuliert (unstim.) Die Phagozytose-Aktivität wurde fluoreszenzmikroskopisch (400-fache Vergrößerung) ermittelt. Mittelwert ± Standardfehler von n=4-9 Ratten pro Gruppe. *$p<0,05$ vs. zugehörige Kontrolle , $^{\$}p<0,05$ vs. zugehöriges unstimuliertes Thoraxtrauma (Two-Way ANOVA).

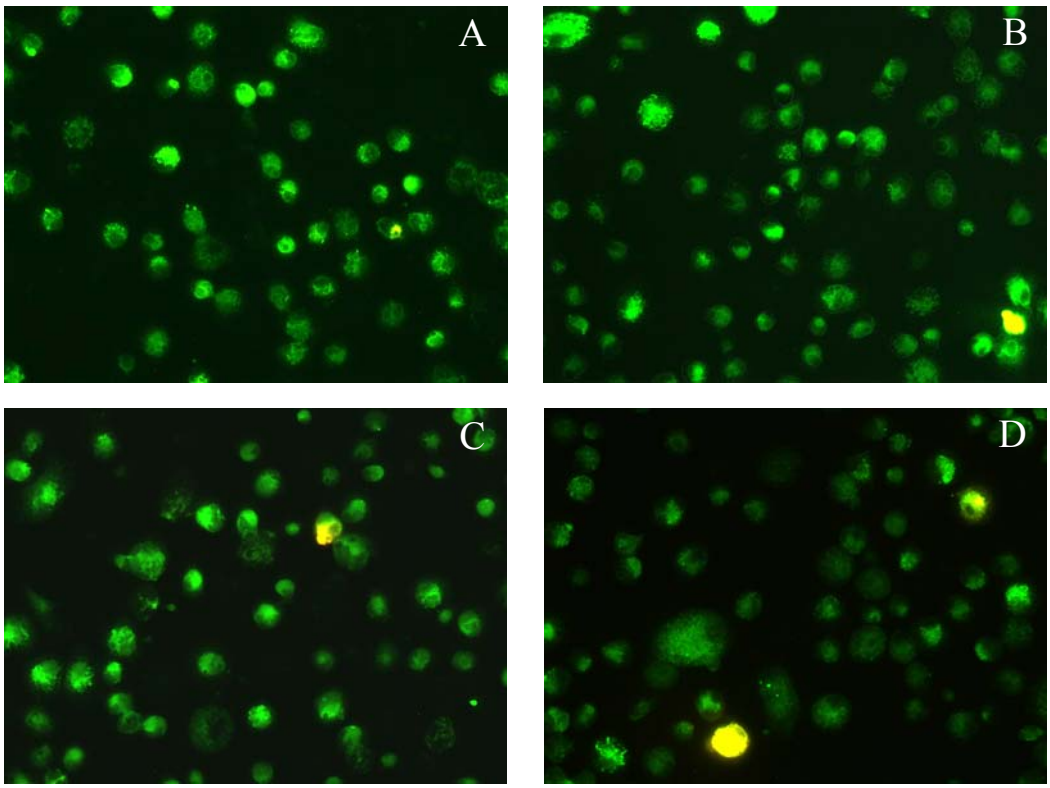

Abb. 15b Exemplarische Darstellung der Alveolarmakrophagen (AMΦ) mit phagozytierten apoptotischen neutrophilen Granulozyten

A+B: AMΦ aus Kontrolltieren 24 Stunden nach Eingriff (B: zusätzliche Stimulation mit PMA). C+D: AMΦ aus traumatisierten Ratten 24 Stunden nach Eingriff (D: zusätzliche Stimulation mit PMA). Die phagozytierenden AMΦ sind anhand ihrer grünen Eigenfluoreszenz erkennbar. Die phagozytierten apoptotischen PMN setzten sich durch die gelb-orange-fluoreszierende Dioctadecyl-Tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat (DiI)-Färbung gegenüber den AMΦ ab. (400-fache Vergrößerung)

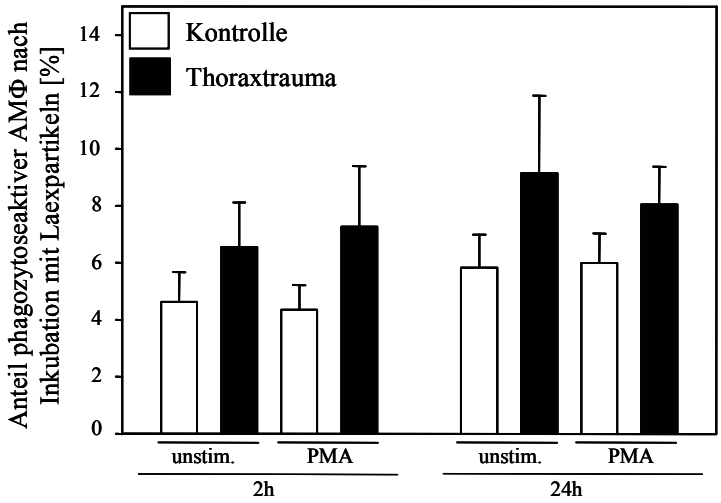

Abb. 16a Phagozytose-Aktivität von Alveolarmakrophagen (AMΦ) gegenüber Latexpartikeln
AMΦ wurden 2 und 24 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert und in einem Verhältnis von 1:10 90 Minuten bei 37°C / 5% CO_2 mit Latexpartikeln inkubiert. Die Hälfte der AMΦ-Zellkulturen wurden vor dieser Inkubation 15 Minuten mit 25 ng/ml Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) stimuliert. Die andere Hälfte blieb unstimuliert (unstim.) Die Phagozytose-Aktivität wurde fluoreszenzmikroskopisch (400-fache Vergrößerung) ermittelt. Mittelwert ± Standardfehler von n=4-9 Ratten pro Gruppe. (Two-Way ANOVA)

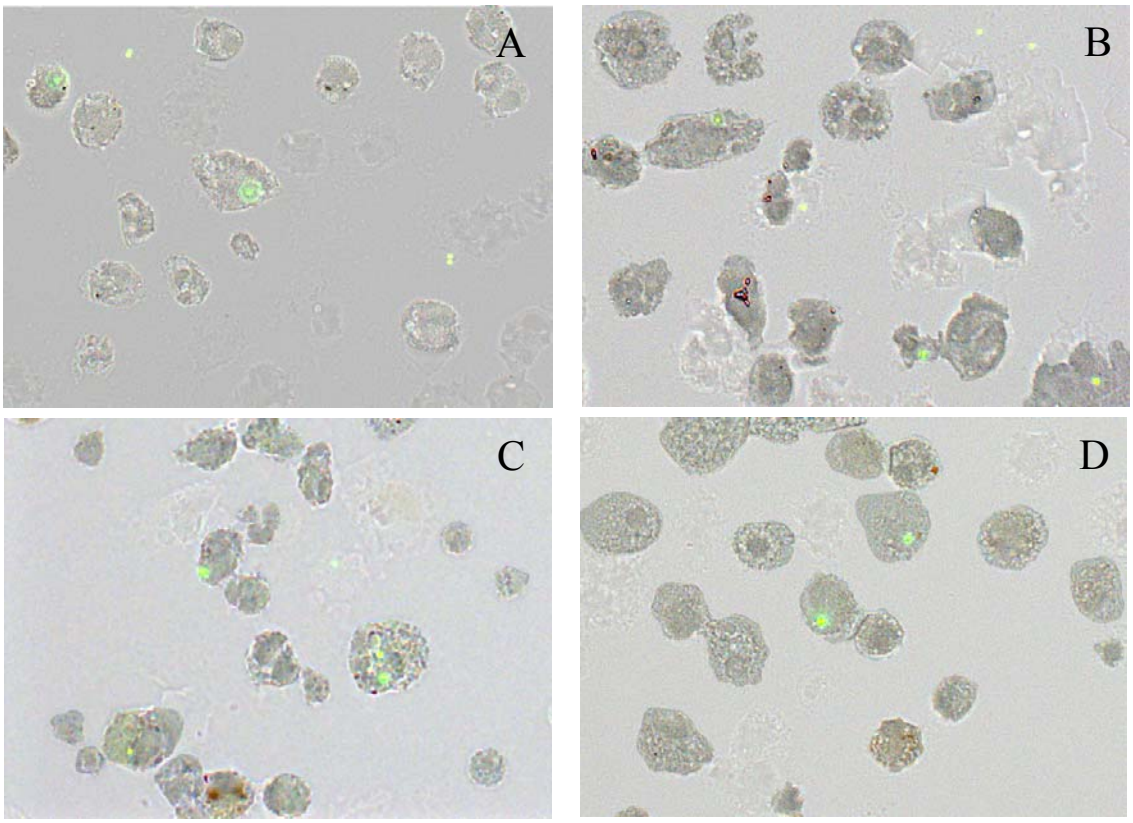

Abb. 16b Exemplarische Darstellung der Alveolarmakrophagen (AMΦ) mit phagozytierten fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln
A+B: AMΦ aus Kontrolltieren 24 Stunden nach Eingriff (B: zusätzliche Stimulation mit PMA). C+D: AMΦ aus traumatisierten Tieren 24 Stunden nach Eingriff (D: zusätzliche Stimulation mit PMA). Die phagozytierenden AMΦ sind durchlichtmikroskopisch dargestellt. Die phagozytierten Latexpartikel sind anhand der grünen Fluoreszenz (FITC) erkennbar. (400-fache Vergrößerung)

Deutliche Unterschiede waren in der Anzahl an ingestierenden Alveolarmakrophagen zwischen den beiden zugesetzten apoptotischen Zelltypen festzustellen. Apoptotische AT2-Zellen wurden von unstimulierten Alveolarmakrophagen unter allen Bedingungen stärker aufgenommen als apoptotische PMN.

3.2.4 Mediatorenfreisetzung durch Alveolarmakrophagen (AMΦ) während der Phagozytose bzw. Efferozytose

Um die durch die Phagozytose initiierte Freisetzung der unterschiedlichen Zytokine zu analysieren, wurde der Kulturüberstand der mit opsonierten Latexpartikel, apoptotischen neutrophilen Granulozyten oder apoptotischen AT2-Zellen koinkubierten AMΦ mittels Multiplex-Assay auf TNF-α, IL-1β, MIP-1α, CINC-1, MCP-1, RANTES, IL-6 und IL-10 untersucht. Ebenfalls wurde der Einfluss von PMA auf die Freisetzung der Zytokine nach einem stumpfen Thoraxtrauma in den Kulturüberständen der mit 25 ng/ml PMA vorstimulierten AMΦ mittels Multiplex-Assay bestimmt.

In AMΦ-Kulturüberständen, deren AMΦ 24 Stunden nach Thoraxtrauma isoliert wurden, und denen keine zu phagozytierenden Materialien zugegeben wurden, konnten sowohl in den mit PMA stimulierten, als auch in den unstimulierten Kulturüberständen signifikant höhere Konzentrationen von TNF-α, IL-1β, MIP-1α, MCP-1 und CINC-1 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in Kulturüberständen von AMΦ aus Kontrolltieren keine Konzentrationserhöhungen festgestellt (Abb. 16,17,18). Die RANTES-Konzentrationen waren zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant jedoch tendenziell ebenfalls erhöht (Abb. 18B1+B2). Die RANTES-Konzentrationen waren in Kulturüberständen von AMΦ ohne Phagozytosemöglichkeit bereits früh, d.h. 2 Stunden nach Thoraxtrauma signifikant erhöht (Abb. 18B1+B2). Die Zugabe von opsonierten Latexpartikel führte zu einem Anstieg der TNF-α–, MIP-1α-, CINC-1- und MCP-1-Konzentrationen in den Kulturüberständen der AMΦ, die 24 Stunden nach Trauma isoliert wurden (Abb. 16A, 17A, 17B, 18A). Die Unterschiede waren jedoch nur in den PMA-stimulierten Kulturen signifikant. Die IL-1β– und RANTES-Abgabe von AMΦ aus traumatisierten Tieren nahm dagegen tendenziell durch die Phagozytose von Latexpartikel ab (Abb. 16B, 18B).

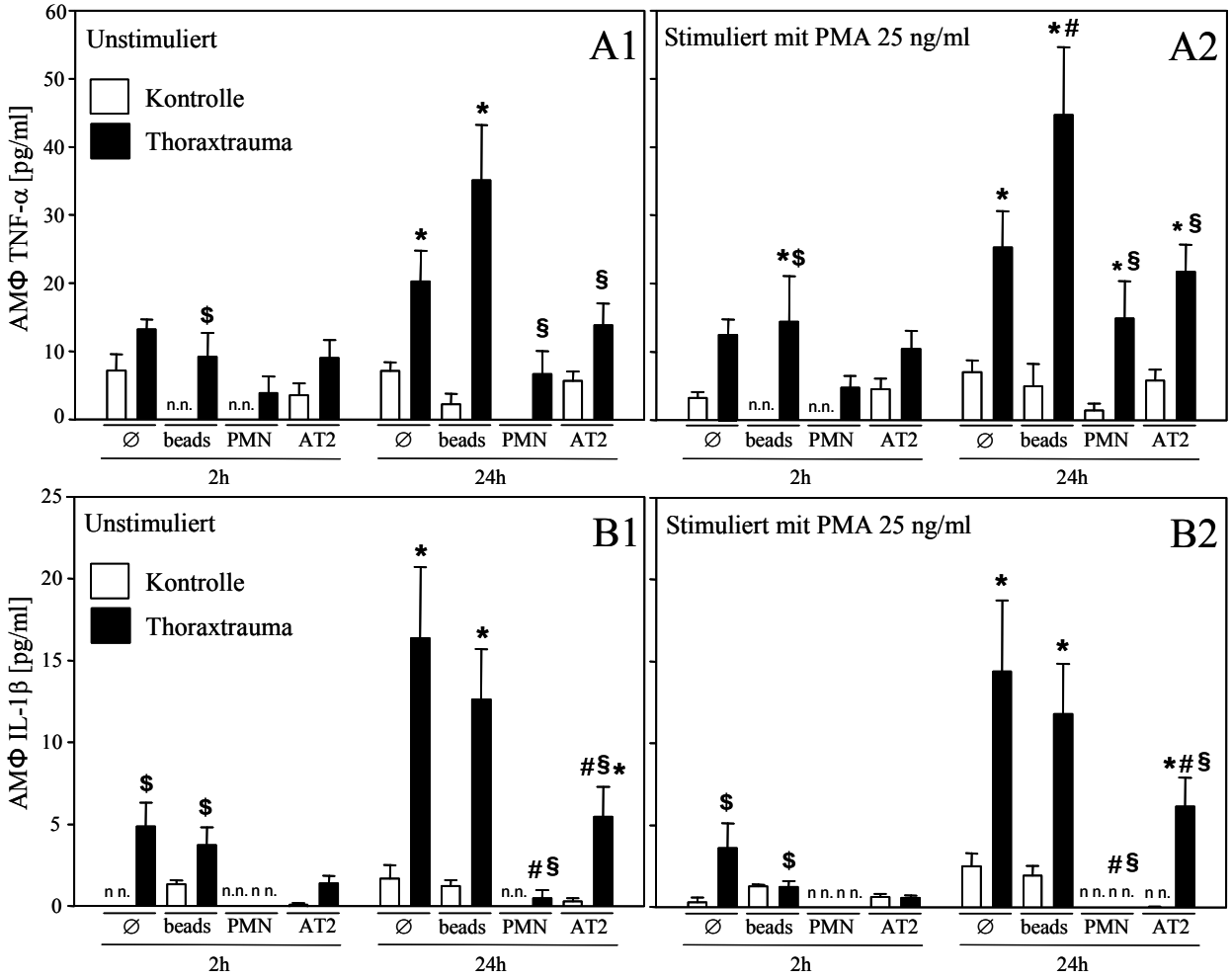

Abb. 17 TNF-α– und IL-1β–Konzentrationen im Alveolarmakrophagen-Kulturüberstand (AMΦ)
AMΦ wurden 2 und 24 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert und 90 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 mit Medium (Ø), Latexpartikeln (beads), apoptotischen neutrophilen Granulozyten (PMN) oder apoptotischen Alveolar Typ 2 (AT2)-Epithelzellen inkubiert. Die TNF-α- und IL-1β-Konzentrationen wurden in unstimulierten (A1+B1) und mit Phorbol-12-myristate-13-acetate stimulierten (25 ng/ml PMA) (A2+B2) AMΦ-Kulturüberständen bestimmt**.** Mittelwert ± Standardfehler von n=4-9 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechender Kontrolle, #p<0,05 vs. Thoraxtrauma 24 h mit Medium, §p<0,05 vs. Thoraxtrauma 24 h mit Latexpartikeln, $p<0,05 vs. entsprechendes Thoraxtrauma 24 h (Two-Way ANOVA) (n n. = nicht nachweisbar)

Die Phagozytose von apoptotischen neutrophilen Granulozyten reduzierte signifikant die Abgabe von TNF-α, IL-1β, MIP-1α, CINC-1, MCP-1 und RANTES der AMΦ, die 24 Stunden nach Thoraxtrauma isoliert wurden, im Vergleich zu AMΦ aus denselben Tieren, denen Latexpartikel zur Phagozytose zugegeben wurden (Abb. 17A+B, 18A+B, 19A+B). Ein signifikanter Unterschied konnte auch zwischen den Konzentrationen von IL-1β in den Kulturüberständen von AMΦ, die 24 Stunden posttrauma isoliert wurden und apoptotische PMN ingestiert haben und denen von AMΦ, die 24 Stunden nach Thoraxtrauma isoliert wurden und lediglich mit Medium kultiviert wurden festgestellt werden (Abb. 17B1).

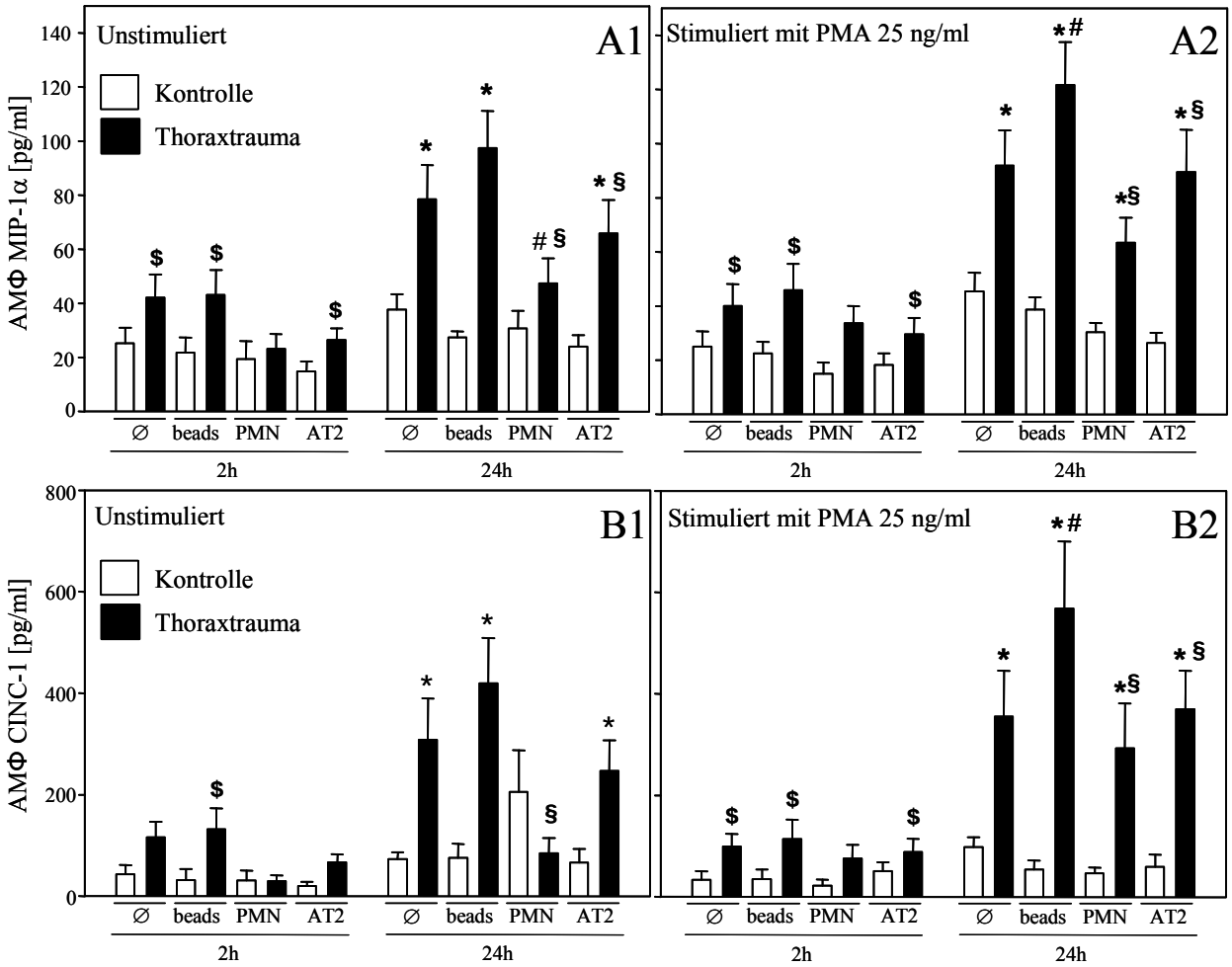

Abb. 18 MIP-1α– und CINC-1–Konzentrationen im Alveolarmakrophagen-Kulturüberstand (AMΦ)
AMΦ wurden 2 und 24 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert und 90 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 mit Medium (Ø), Latexpartikeln (beads), apoptotischen neutrophilen Granulozyten (PMN) oder apoptotischen Alveolar Typ 2 (AT2)-Epithelzellen inkubiert. Die MIP-1α- und CINC-1-Konzentrationen wurden in unstimulierten (A1+B1) und mit Phorbol-12-myristate-13-acetate stimulierten (25 ng/ml PMA) (A2+B2) AMΦ-Kulturüberständen bestimmt. Mittelwert ± Standardfehler von n=4-9 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechender Kontrolle, #p<0,05 vs. Thoraxtrauma 24 h mit Medium, §p<0,05 vs. Thoraxtrauma 24 h mit Latexpartikel, $p<0,05 vs. entsprechendes Thoraxtrauma 24 h (Two-Way ANOVA)

Dasselbe gilt für die Konzentrationen von MIP-1α und MCP-1 in den unstimulierten Kulturüberständen des 24 Stunden-Zeitpunkts (Abb. 18A1+19A1).

Die Aufnahme von apoptotischen AT2-Zellen durch AMΦ, die 24 Stunden nach Thoraxtrauma isoliert wurden, verursachte eine signifikant niedrigere IL-1β-Abgabe verglichen mit der IL-1β-Abgabe von AMΦ aus den gleichbehandelten Tieren ohne Phagozytosemöglichkeit (Abb. 17B1+2). Der signifikante Anstieg von TNF-α im Kulturüberstand von nicht-phagozytierenden AMΦ, die 24 Stunden nach Thoraxtrauma isoliert wurden, wurde bei AMΦ, die apoptotische AT2-Zellen aufgenommen hatten, gedämpft (Abb. 17A1+2). Durch die Phagozytose der apoptotischen AT2-Zellen wurde auch die Abgabe von RANTES durch AMΦ sowohl nach 2 wie nach 24 Stunden unter

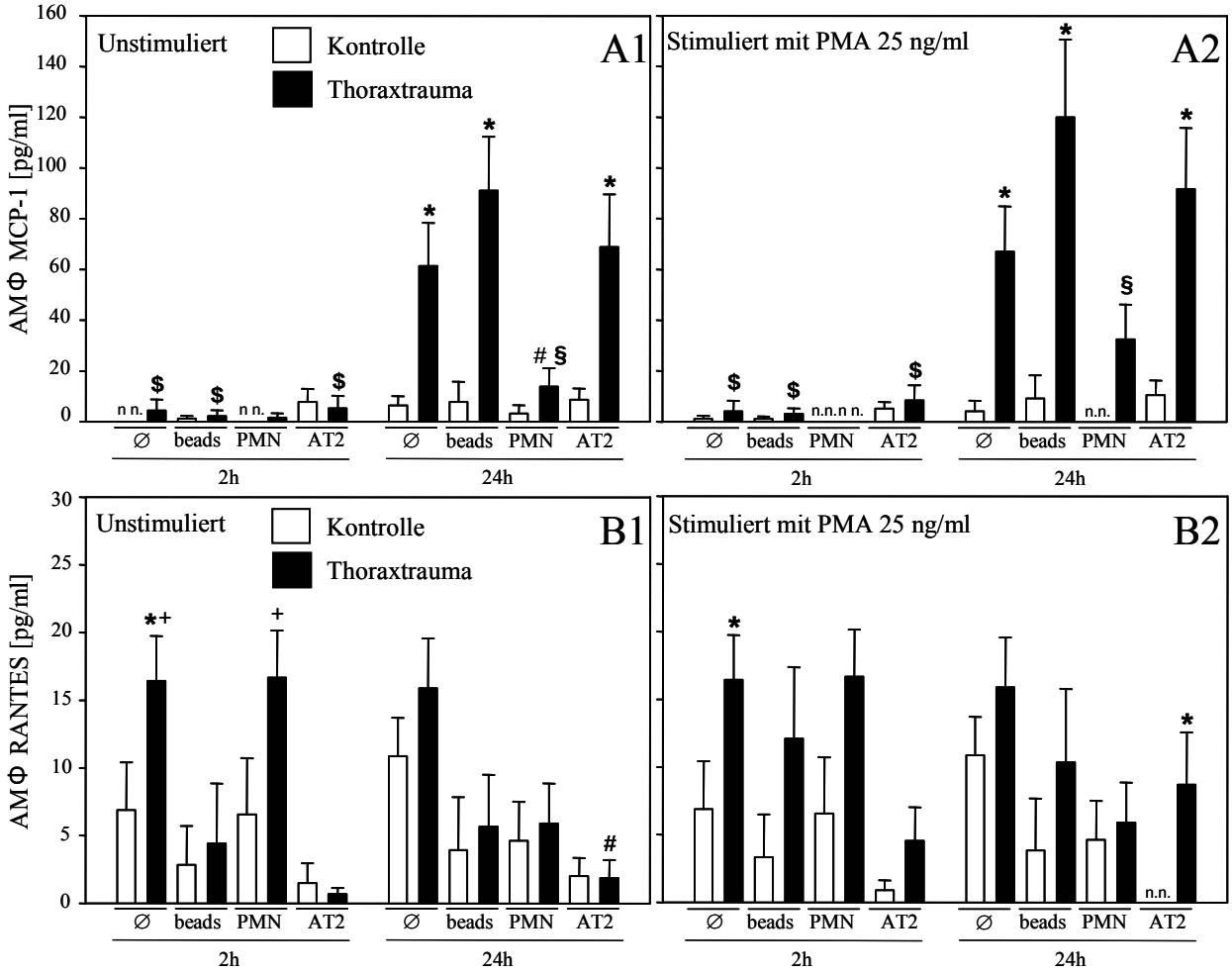

Abb. 19 MCP-1– und RANTES–Konzentrationen im Alveolarmakrophagen-Kulturüberstand (AMΦ)
AMΦ wurden 2 und 24 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert und 90 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 mit Medium (Ø), Latexpartikeln (beads), apoptotischen neutrophilen Granulozyten (PMN) oder apoptotischen Alveolar Typ 2 (AT2)-Epithelzellen inkubiert. Die MCP-1- und RANTES-Konzentrationen wurden in unstimulierten (A1+B1) und mit Phorbol-12-myristate-13-acetate stimulierten (25 ng/ml PMA) (A2+B2) AMΦ-Kulturüberständen bestimmt. Mittelwert ± Standardfehler von n=4-9 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechender Kontrolle, #p<0,05 vs. Thoraxtrauma 24 h mit Medium, §p<0,05 vs. Thoraxtrauma 24 h mit Latexpartikel, $p<0,05 vs. entsprechendes Thoraxtrauma 24 h, +p<0,05 vs. Thoraxtrauma 2 und 24 h mit apoptotischen AT2-Zellen (Two-Way ANOVA) (n.n. = nicht nachweisbar)

unstimulierten Bedingungen nach Thoraxtrauma stark reduziert. Diese Reduktion konnte durch die Stimulation mit PMA aufgehoben werden (Abb. 19 B1+2). In AMΦ-Kulturüberständen mit zugesetzten apoptotischen AT2-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen von MIP-1α, CINC-1 und MCP-1 gegenüber AMΦ aus den selben Tieren ohne Phagozytosemöglichkeit mit Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung nachgewiesen werden (Abb. 18, 19A).

Die Abgabe des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 durch unstimulierte Alveolarmakrophagen wurde früh nach Thoraxtrauma hochreguliert (Abb. 20A). Hier konnte zwei Stunden nach dem Thoraxtrauma ein signifikanter Anstieg im Kulturüberstand der Alveolarmakrophagen ohne zu phagozytierendes Material festgestellt werden. Durch die

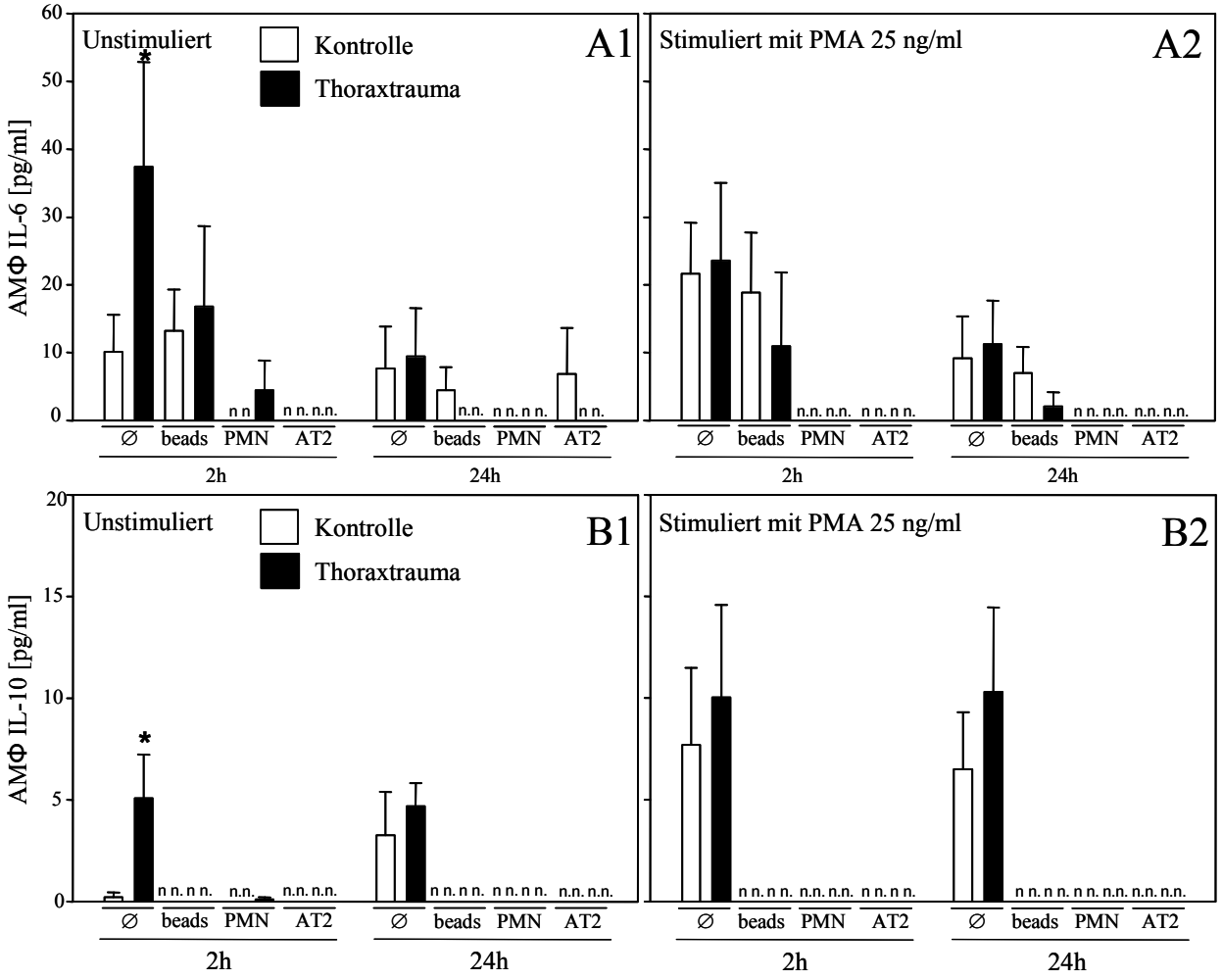

Abb. 20 IL-6– und IL-10–Konzentrationen im Alveolarmakrophagen-Kulturüberstand (AMΦ)
AMΦ wurden 2 und 24 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert und 90 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 mit Medium (Ø), Latexpartikeln (beads), apoptotischen neutrophilen Granulozyten (PMN) oder apoptotischen Alveolar Typ 2 (AT2)-Epithelzellen inkubiert. Die IL-6- und IL-10-Konzentrationen wurden in unstimulierten (A1+B1) und mit Phorbol-12-myristate-13-acetate stimulierten (25 ng/ml PMA) (A2+B2) AMΦ-Kulturüberständen bestimmt**.** Mittelwert ± Standardfehler von n=4-9 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechender Kontrolle, #p<0,05 vs. Thoraxtrauma 24 h mit Medium, §p<0,05 vs. Thoraxtrauma 24 h mit Latexpartikel, $p<0,05 vs. entsprechendes Thoraxtrauma 24 h (Two-Way ANOVA) (n n. = nicht nachweisbar)

Zugabe von Latexpartikeln kam es zur Aufhebung dieses Konzentrationsanstiegs. Die Zugabe von apoptotischen Zellen hingegen führte zu einer fast gänzlichen Unterdrückung der Freisetzung von IL-6 in unstimulierten und stimulierten Alveolarmakrophagen-Kulturen. Der Nachweis des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 im Kulturüberstand unstimulierter Alveolarmakrophagen zeigte ebenfalls einen frühen signifikanten Konzentrationsanstieg nach Thoraxtrauma (Abb. 20B1). Durch die Zugabe von zu phagozytierendem Material kam es zur Abnahme dieses Zytokins in den Kulturüberständen der Alveolarmakrophagen. Da die Konzentrationen von IL-10 an der unteren Nachweisgrenze des Verfahrens liegen, sind diese Daten nur bedingt aussagekräftig.

Die Konzentrationen der ermittelten Zytokine in den Kulturüberständen der stimulierten und unstimulierten ingestierenden Alveolarmakrophagen unterschieden sich nicht fast nicht. Lediglich die Latexpartikel ingestierenden Alveolarmakrophagen, die 24 Stunden nach Thoraxtrauma isoliert wurden, sezernierten durch die PMA-Stimulation signifikant mehr MIP-1- und die CINC-1 in den Kulturüberständen, als unstimuliert.

3.2.5 Freisetzung von löslichem Fas-Ligand (sFasL) durch Alveolarmakrophagen (AMΦ) während der Phagozytose bzw. Efferozytose

Um zu überprüfen, ob der Anstieg der sFasL-Konzentration im Kulturüberstand der AMΦ (Abb. 6) durch die Phagozytose der unterschiedlichen Materialien mit dem dadurch veränderten Zytokinspiegel beeinflusst wird, wurden in den Kulturüberständen auch die Konzentrationen von sFasL mittels ELISA ermittelt. Sowohl in Kulturüberständen, in denen die AMΦ nicht stimuliert wurden, als auch in den Kulturüberständen mit PMA-stimulierten AMΦ konnte ohne die Zugabe von zu phagozytierendem Material ein signifikanter Anstieg der sFasL-Konzentration 24 Stunden nach Thoraxtrauma nachgewiesen werden (Abb. 21A+B).

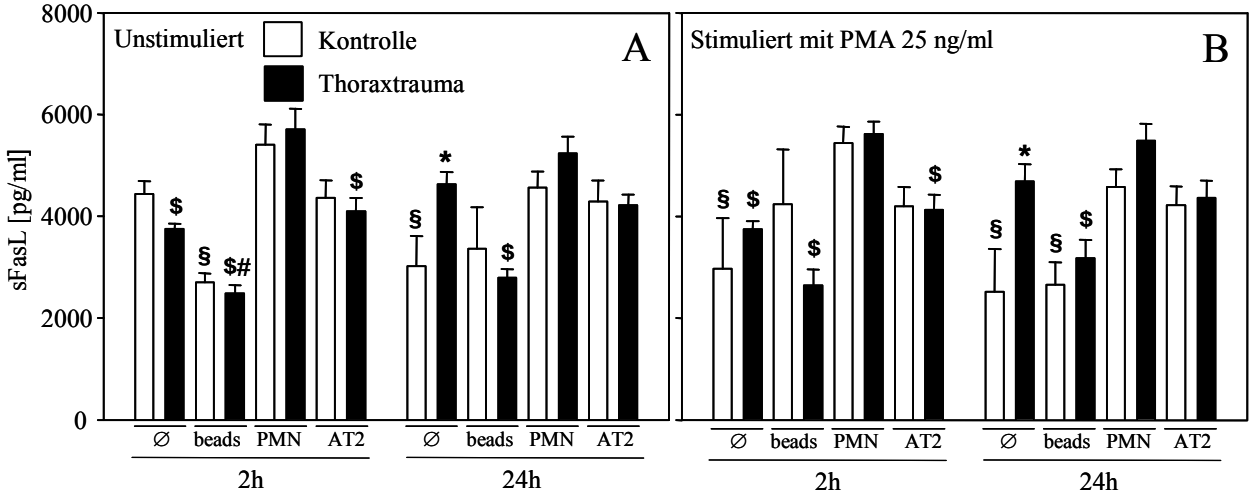

Abb. 21 Konzentrationen des löslichen Fas-Ligand (sFasL) in Alveolarmakrophagen (AMΦ) - Kulturüberständen

AMΦ wurden 2 und 24 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert und 90 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 mit Latexpartikeln (beads), apoptotischen neutrophilen Granulozyten (PMN), apoptotischen Alveolar Typ 2 (AT2)-Epithelzellen oder nur mit Medium (Ø) inkubiert. Die sFasL-Konzentrationen wurden im unstimulierten (A) und mit Phorbol-12-myristate-13-acetate stimulierten (25 ng/ml PMA) (B) AMΦ-Kulturüberstand bestimmt. Mittelwert ± Standardfehler von n=4-5 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle, #p<0,05 vs. entsprechendes Thoraxtrauma mit apopt. AT2 Zellen, §p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle mit apopt. PMN, $p<0,05 vs. entsprechendes Thoraxtrauma mit apopt. PMN. (Two-Way ANOVA)

Die Zugabe von apoptotischen PMN führte zu signifikant höheren sFasL-Konzentrationen in AMΦ-Kulturüberständen, die 2 Stunden nach Thoraxtrauma in Kultur genommen wurden

sowohl gegenüber AMΦ, die 2 Stunden nach Thoraxtrauma nur mit Medium, als auch gegenüber AMΦ, die mit Latexpartikeln oder mit apoptotischen AT2-Zellen inkubiert wurden. Die Zugabe von Latexpartikeln zu AMΦ, die 2 Stunden nach Thoraxtrauma isoliert wurden, führte zu signifikant niedrigeren sFasL-Konzentrationen in den AMΦ-Kulturüberständen, als sie in Kulturüberständen mit dem Zusatz von apoptotischen AT2-Zellen nachweisbar waren.

3.2.6 Surfactant-Proteine (SP) in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die opsonierende Wirkung des Surfactants der Lunge beruht auf den Surfactant-Proteinen SP-A und SP-D. Da beide Collectine sowohl bei der Aufnahme von körperfremdem Material als auch von apoptotischen Zellen eine wichtige Rolle spielen, wurden sie in den 6, 24 und 48 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollbehandlung gewonnenen bronchoalveolären Lavagen mittels Western Blot analysiert.

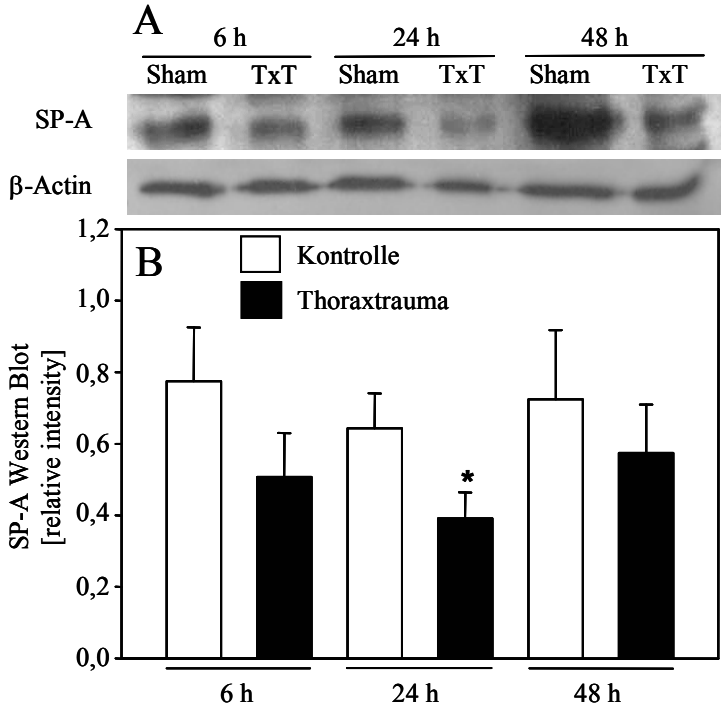

Abb. 22 Surfactant-Protein A-Nachweis (SP-A) in der Bronchoalveolären Lavage (BAL)
6, 24 und 48 Stunden (h) nach Thoraxtrauma (TxT) bzw. Kontrollbehandlung (Sham) wurde die BAL gewonnen. SP-A wurde in der BAL mittels Western Blot nachgewiesen. (A) Repräsentative Western Blots. (B) Die SP-A-Konzentrationen in relativer Intensität, d.h. die densitometrisch ermittelte Intensität (IDT) der SP-A-Western-Blot-Banden normalisiert auf die IDT-Werte von β-Actin. Mittelwert ± Standardfehler von n=10-12 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle (ANOVA)

Die SP-A-Konzentrationen in der BAL der Traumatiere waren tendenziell zu allen drei Zeitpunkten gegenüber denen der Kontrolltiere erniedrigt. 24 Stunden nach Thoraxtrauma

verringerten sich die SP-A-Konzentrationen signifikant auf etwa die Hälfte der in Kontrolltieren nachweisbaren Konzentrationen (Abb. 22).

Auch die Konzentrationen von SP-D nahmen nach dem Thoraxtrauma in der BAL ab. Hier konnte 6 Stunden nach Thoraxtrauma eine starke Reduktion auf ein Drittel der SP-D-Konzentrationen, die in der BAL aus Kontrolltieren ermittelt wurde, nachgewiesen werden. 24 Stunden nach Thoraxtrauma waren die Konzentrationen von SP-D bereits wieder auf Werte in Höhe der Konzentrationen der BAL aus Kontrolltiere hochreguliert (Abb. 23). Auch 48 Stunden nach Thoraxtrauma blieben die SP-D-Konzentrationen weiter auf diesem Niveau.

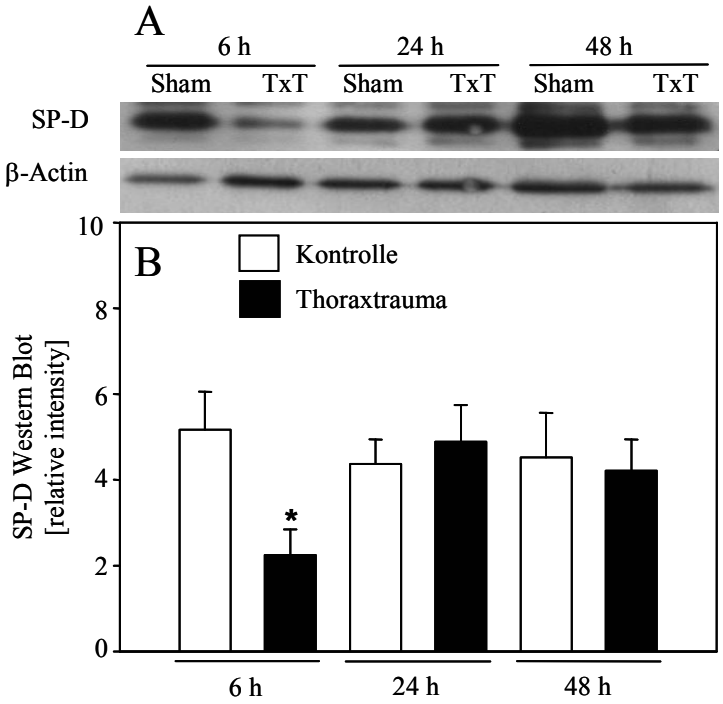

Abb. 23 Surfactant-Protein D-Nachweis (SP-D) in der Bronchoalveolären Lavage (BAL)
6, 24 und 48 Stunden (h) nach Thoraxtrauma (TxT) bzw. Kontrollbehandlung (Sham) wurde die BAL gewonnen. SP-D wurde in der BAL mittels Western Blot nachgewiesen. (A) Repräsentative Western Blots. (B) Die SP-D-Konzentrationen in relativer Intensität, d.h. die densitometrisch ermittelte Intensität (IDT) der SP-D-Western-Blot-Banden normalisiert auf die IDT-Werte von β-Actin. Mittelwert ± Standardfehler von n=10-12 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle (ANOVA)

3.2.7 Fractalkine-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die Freisetzung von Fractalkine durch apoptotische Zellen wirkt chemotaktisch auf Makrophagen und fördert die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen. Die Fractalkine-Konzentrationen wurden in der BAL, die 6, 24 und 48 Stunden nach Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung gewonnen wurde, mittels ELISA analysiert (Abb. 24). Bereits 6 Stunden nach Thoraxtrauma konnten erhöhte Fractalkine-Konzentrationen in der BAL nachgewiesen werden. 24 Stunden nach Thoraxtrauma stiegen

die Fractalkine-Konzentrationen weiter auf das Doppelte der Konzentrationen, die in der BAL aus Kontrolltieren ermittelt werden konnte. Danach kam es zum Absinken, so dass nach 48 Stunden nur noch eine geringe Differenz zwischen den Fractalkine-Konzentrationen der BAL aus traumatisierten Tieren und BAL aus Kontrolltieren festgestellt werden konnte.

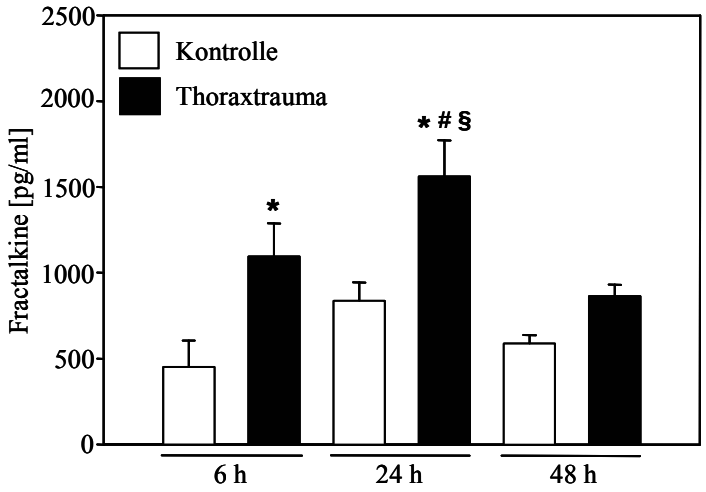

Abb. 24 Fractalkine-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL)
Die BAL wurde 6, 24 und 48 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert. Die Fractalkine-Konzentrationen wurden mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Mittelwert ± Standardfehler von n=4-5 Ratten pro Gruppe. *$p<0,05$ vs. entsprechender Kontrolle, $^{\#}p<0,05$ vs. Thoraxtrauma 6 h und 48 h, $^{\S}p<0,05$ vs. Kontrolle 6 h und 48 h (ANOVA)

3.2.8 *In vivo*-Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen (AMΦ) nach intratrachealer Instillation von opsonierten Latexpartikeln

Nachdem *in vitro* eine tendenzielle Steigerung der phagozytotischen Aktivität der AMΦ gegenüber Latexpartikeln festgestellt werden konnte und die Analyse der BAL zeigte, dass die Konzentrationen der beiden phagozytosefördernden Collectine SP-A- und SP-D nach einem stumpfen Thoraxtrauma absinken, die Konzentration des ebenfalls die Phagozytose fördernden Fractalkines jedoch ansteigen, sollte *in vivo* die Effektivität der Phagozytose der AMΦ nach einem Thoraxtrauma untersucht werden. Dazu wurden Ratten 2 bzw. 24 Stunden nach Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung opsonierte FITC-gelabelte Latexpartikel intratracheal instilliert. Die Zahl der AMΦ mit ingestierten Latexpartikel wurde nach 2,5 Stunden in der BAL durchflusszytometrisch bestimmt. Bereits 2 Stunden nach dem Thoraxtrauma nahm der Anteil von phagozytierenden AMΦ an der Gesamtzahl der mittels BAL isolierten AMΦ gegenüber dem der aus Kontrolltieren isolierten ab (Abb. 25). Von den AMΦ, die 24 Stunden nach dem Thoraxtrauma entnommen wurden, hatten signifikant weniger, nämlich nur etwa 20 Prozent der AMΦ, Latexpartikel ingestiert.

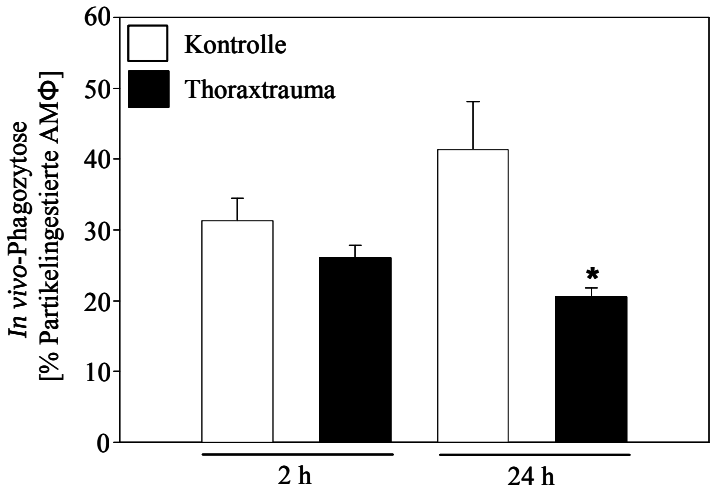

Abb. 25 *In-vivo* Phagozytose
Männlichen CD-Ratten wurde 2 bzw. 24 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma opsonierte FITC-gelabelte Latexpartikel intratracheal instilliert. Nach 2,5 h wurden die Ratten getötet und die AMΦ mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnen. Die Phagozytose-Aktivität wurde sowohl fluoreszenzmikroskopisch (400-fache Vergrößerung) als auch durchflusszytometrisch ermittelt. Mittelwert ± Standardfehler von n=4-9 /Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle (Two-Way ANOVA)

3.2.9 Surfactant-Protein D - mRNA-Expression in Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen)

Um die Expression von SP-D auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR zu analysieren, wurden die AT2-Zellen nach ihrer Isolation lysiert, aufgereinigt, transkribiert und die cDNA anhand der Amplifikation in der RT-PCR nachgewiesen.

Zwei Stunden nach dem Thoraxtrauma stieg die Expression von SP-D in den isolierten AT2-Zellen signifikant um den Faktor 2 gegenüber den AT2-Zellen der Kontrolltiere. 24 Stunden nach dem Thoraxtrauma war die Expression von SP-D unter die Hälfte der m-RNA-Expressionshöhe der AT2-Zellen aus Kontrolltieren zurückgefallen (Abb. 26).

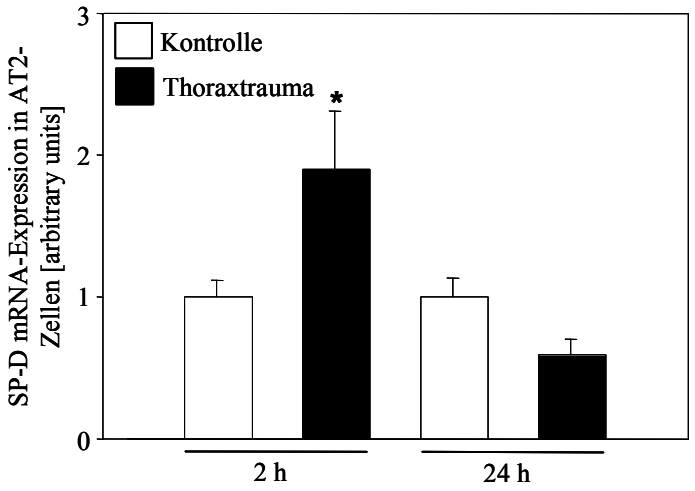

Abb. 26 Surfactant Protein D (SP-D)-mRNA-Expression der Alveolar Typ 2 (AT2)-Epithelzellen
Die AT2-Zellen wurden 2 und 24 Stunden (h) nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma isoliert. Die SP-D-mRNA Expression dieser Zellen wurde mittels RT-PCR analysiert. Die Werte sind auf das Housekeeping-Gen Beta-2-Microglobulin normalisierte Mittelwerte der relativen Expression ± Standardfehler von n=6-10 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle (ANOVA)

3.2.10 Zytokin-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage nach intratrachealer Instillation von opsonierten Latexpartikeln

Wie unter 3.2.8 beschrieben, konnte nach der Induktion eines Thoraxtraumas eine prozentuale Abnahme an phagozytotisch aktiven AMΦ *in vivo* anhand der intratrachealen Instillation von opsonierten Latexpartikeln festgestellt werden. Eine reaktive Änderung der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen auf die Instillation bzw. auf die Phagozytose der opsonierten Latexpartikel im bronchoalveolären Kompartiment sollte durch die Untersuchung der BAL auf einige pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine ermittelt werden. Die Konzentrationen von TNF-α, IL-1β, CINC-1, MCP-1, RANTES und IL-6 wurden in der BAL von Tieren mit und ohne Instillation von Latexpartikeln 2 und 24 Stunden nach Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung mittels Multiplex analysiert.

Die Konzentration von TNF-α in der BAL stieg durch die Instillation von opsonierten Latexpartikeln sowohl in den traumatisierten als auch in den Kontroll-Tieren um ein Vielfaches an (Abb. 27A). Zwischen BAL aus traumatisierten Tieren und Kontrolltieren konnte weder zum 2-Stunden, noch zum 24-Stundenzeitpunkt ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

IL-1β war in der BAL nicht-instillierter Tiere 24 Stunden nach dem Thoraxtrauma nachweisbar (Abb. 27B). Erst durch die Instillation der Latexpartikel konnte zwei Stunden nach der Thoraxtrauma und Kontrollbehandlung IL-1β in Konzentrationen über der Nachweisgrenze festgestellt werden. Dabei waren die IL-1β-Konzentrationen der BAL aus

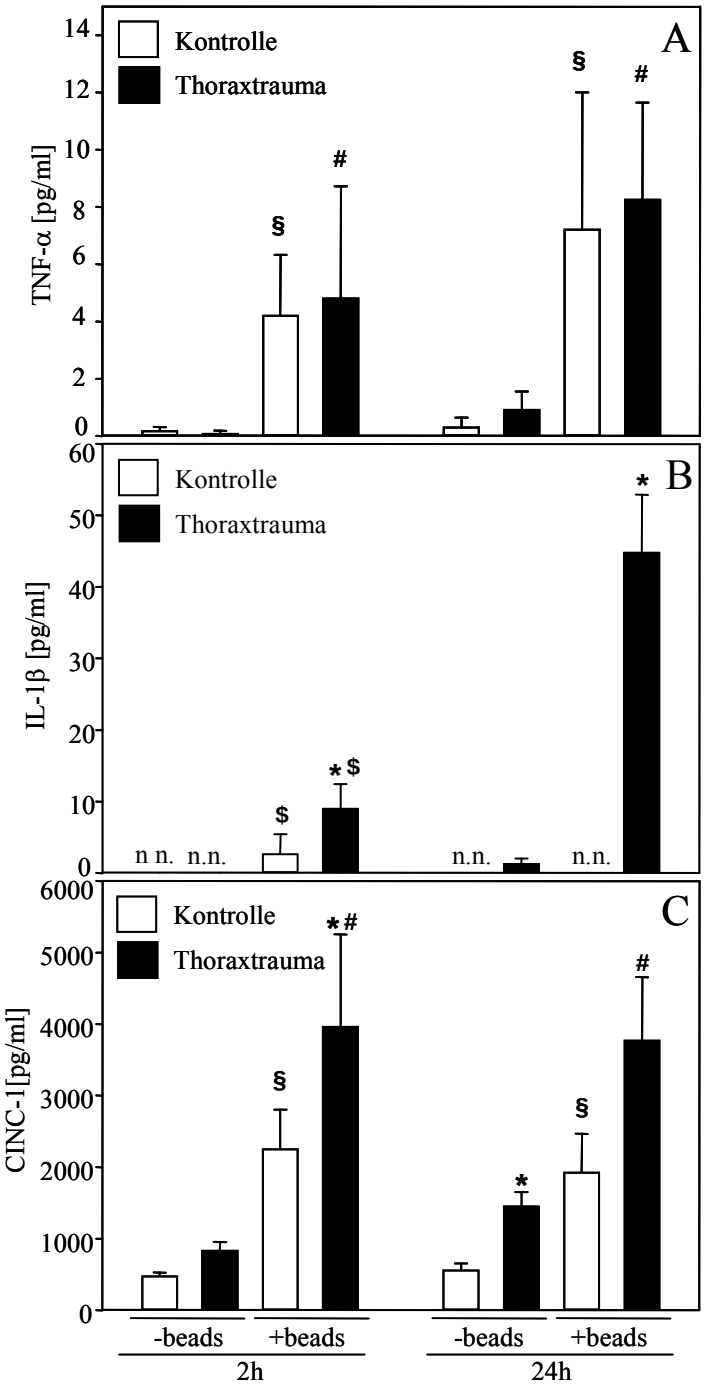

Abb. 27 TNF-α–, IL-1β- und CINC-1-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage (-beads) und in der bronchoalveolären Lavage nach Instillation von Latexpartikeln (+beads)

Zwei und 24 Stunden nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma wurden 1×10^8 FITC-gelabelte Latexpartikel in 1 ml PBS intratracheal instilliert. Parallel wurde jeweils eine Kontrollinstillation mit PBS an kontrollbehandelten und Thoraxtrauma-Tieren durchgeführt. 2,5 Stunden nach Instillation wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. In der BAL wurden die TNF-α-, IL-1β- und CINC-1-Konzentrationen mittels Multiplex bestimmt. Mittelwert ± Standardfehler von n=4-9 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle, §p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle ohne Latexpartikel, #p<0,05 vs. entsprechendes Thoraxtrauma ohne Latexpartikel, $p<0,05 vs. entsprechende Thoraxtrauma 24 h, (Two-Way ANOVA) (n.n. = nicht nachweisbar)

Thoraxtraumatieren zu diesem Zeitpunkt viermal so hoch wie diejenigen der BAL aus dem Kontrolltieren. Nach 24 Stunden sank die IL-1β-Konzentration in der BAL von Tieren mit Kontrollbehandlung und Latexpartikel-Instillation unter die Nachweisgrenze. Im Gegensatz

dazu führte die Instillation der Latexpartikel in der BAL traumatisierter Tieren zu einem 20-fachen Anstieg der IL-1β-Konzentration gegenüber den BAL-Konzentrationen traumatisierter, jedoch nicht instillierter Tieren.

Der Gehalt an CINC-1 in der BAL verdoppelte sich 2 Stunden nach dem Thoraxtrauma (Abb. 27C). 24 Stunden nach dem Thoraxtrauma erhöhte sich der Gehalt auf das 3-fache der CINC-1-Konzentration der BAL aus Kontrolltieren. Durch die zusätzliche Instillation der Latexpartikel kam es zu beiden Zeitpunkten zur Vervielfachung dieser Konzentrationen, wobei die Differenz zwischen BAL aus traumatisierten Tieren und BAL aus Kontrolltieren erhalten blieb.

2 Stunden und 24 Stunden nach der Induktion des Thoraxtraumas stiegen auch die Konzentrationen an MCP-1 in der BAL an (Abb. 28A). Zwei Stunden nach der Intervention war die Differenz der MCP-1-Konzentrationen zwischen BAL aus traumatisierten Tieren und BAL aus Kontrolltieren minimal. 24 Stunden danach führte das Thoraxtrauma zu einem Anstieg um den Faktor 30. Die Instillation der Latexpartikel steigerte die Freisetzung von MCP-1 in die BAL in Thoraxtraumatieren nach 2 Stunden um das Vierfache. Auch 24 Stunden nach der Induktion des Thoraxtraumas konnte eine Erhöhung der Konzentration durch die Instillation um ca. die Hälfte beobachtet werden.

Die Konzentrationserhöhung von RANTES 2 Stunden nach einem Thoraxtrauma wurde durch die Instillation von opsonierten Latexpartikeln auf das Doppelte verstärkt (Abb. 28B). Bei Instillation der Latexpartikel 24 Stunden nach dem Thoraxtrauma konnte eine tendenzielle Absenkung des Gehalts an RANTES gegenüber der Konzentration der Kontroll-BAL auf die Hälfte festgestellt werden.

Die Konzentrationen von IL-6 in der BAL aus Tieren, denen keine Latexpartikel instilliert wurden, waren mit Ausnahme der BAL aus 24 Stunden-Traumatieren unter der Nachweisgrenze des verwendeten Multiplexes (Abb. 28C). 24 Stunden nach Thoraxtrauma konnte ein klares Ansteigen der IL-6-Konzentration auf ca. 200 pg/ml nachgewiesen werden. Mit der Instillation der Latexpartikel stiegen sämtliche Werte über die Nachweisgrenze. Nach 2 Stunden erhöhte sich die IL-6-Konzentration von kontrollbehandelten zu traumatisierten Tieren durch die zusätzliche Instillation der Latexpartikel um das Sechsfache. Nach 24 Stunden induzierte das Thoraxtrauma eine Steigerung um den Faktor 10.

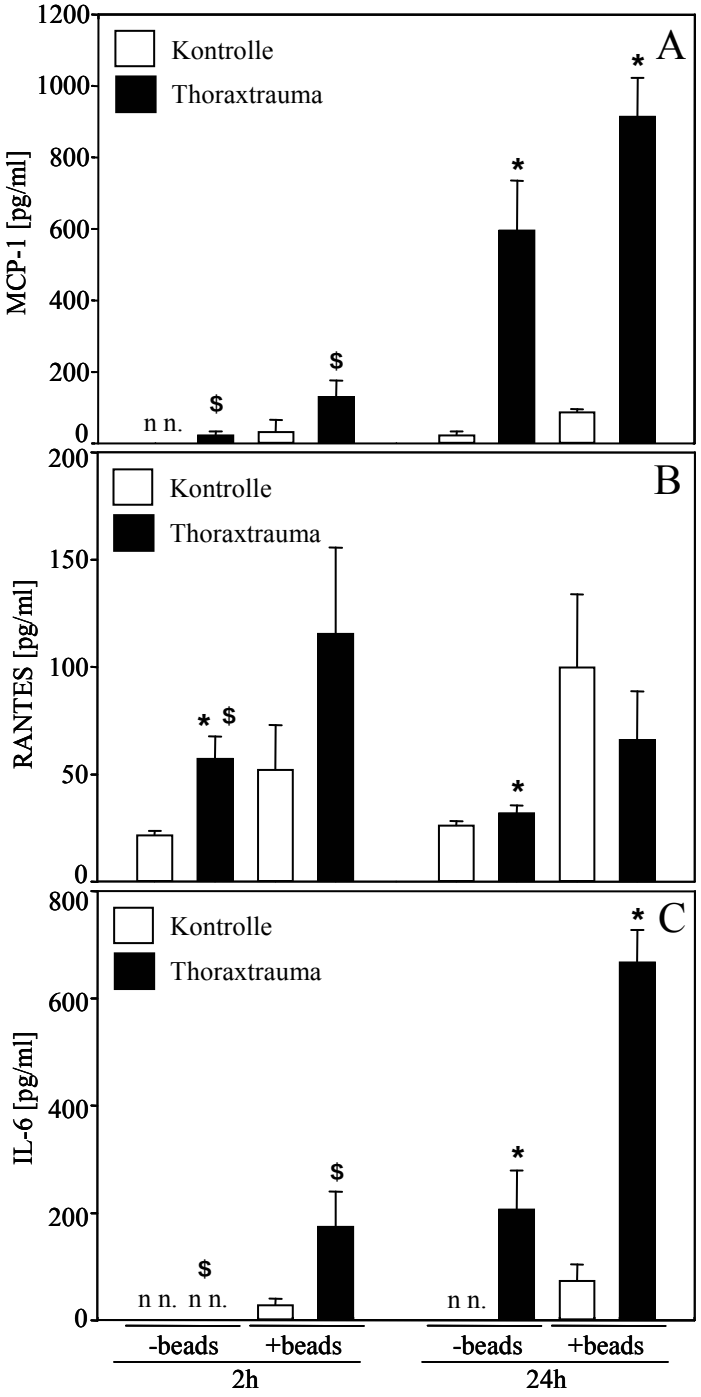

Abb. 28 MCP-1-, RANTES- und IL-6-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage (-beads) und in der bronchoalveolären Lavage nach Instillation von Latexpartikeln (+beads)

Zwei und 24 Stunden nach Kontrollbehandlung bzw. Thoraxtrauma wurden 1×10^8 FITC-gelabelte Latexpartikel in 1 ml PBS intratracheal instilliert. 2,5 Stunden nach Instillation wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. In der BAL wurden die MCP-1-, RANTES- und IL-6-Konzentrationen mittels Multiplex bestimmt. Mittelwert ± Standardfehler von n=4-9 Ratten pro Gruppe. *p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle, $^{\$}$p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle ohne Latexpartikel, $^{\#}$p<0,05 vs. entsprechendes Thoraxtrauma ohne Latexpartikel, $^{\$}$p<0,05 vs. entsprechende Thoraxtrauma 24 h, (Two-Way ANOVA) (n n. = nicht nachweisbar)

3.2.11 *In vitro*-Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen nach Behandlung mit Schwefelwasserstoff (H_2S)

Nach Induktion des Thoraxtraumas bzw. der Kontrollbehandlung wurden die Ratten in den Expositionskammern 6 Stunden H_2S ausgesetzt. Entsprechend behandelte Kontrolltiere wurden parallel in Raumluft gehalten. Die AMΦ wurden 6, 24 und 48 Stunden nach dem Eingriff durch eine BAL entnommen. Die 48 Stunden nach dem Thoraxtrauma auftretende signifikante Differenz zwischen dem Anteil phagozytoseaktiver AMΦ aus traumatisierten und aus nicht traumatisierten Ratten wurden durch eine leichte Steigerung der Phagozytoseaktivität der AMΦ aus Kontrolltieren durch die H_2S-Behandlung aufgehoben (Abb. 29).

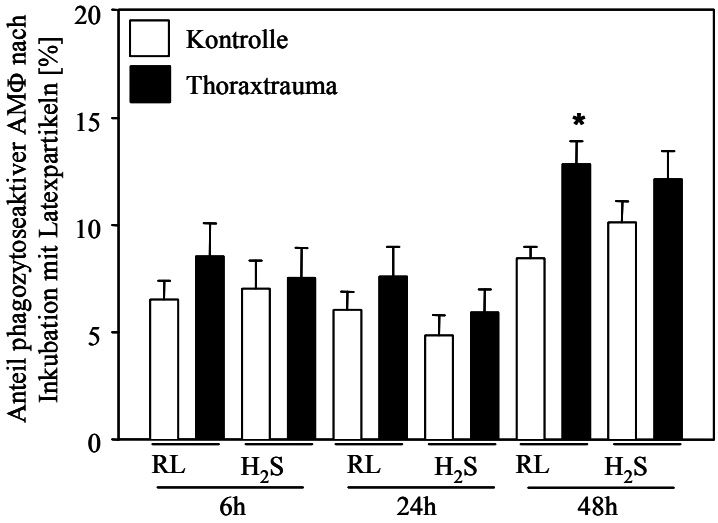

Abb. 29 Phagozytose-Aktivität von Alveolarmakrophagen (AMΦ) nach Schwefelwasserstoff (H_2S)-Exposition

Männliche CD-Ratten wurden einem Thoraxtrauma oder einer Kontrollbehandlung unterzogen und danach für 6 Stunden 100 ppm H_2S- oder Kontroll (RL)-Gas exponiert. Die AMΦ wurden 6, 24 und 48 Stunden (h) nach Kontrolleingriff bzw. Thoraxtrauma isoliert und in einem Verhältnis von 1:10 90 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 mit FITC-gelabelten Latexpartikeln inkubiert. Die Phagozytose-Aktivität wurde im Durchflusszytometer ermittelt. Mittelwert ± Standardfehler von n=8-10 Ratten pro Gruppe, *p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle. (Two-Way ANOVA)

4 Diskussion

Das stumpfe Thoraxtrauma stellt eine der häufigsten Verletzungen bei Verkehrsunfällen dar. Durch die Beteiligung der Lunge kommt es bei polytraumatisierten Patienten mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zu respiratorischem Versagen [198]. Ebenso steigt die Mortalitätsrate signifikant an, wenn im Verletzungsmuster eine Beeinträchtigung der Lunge vorliegt [58].

Um in diesem Zusammenhang die Auswirkungen des Thoraxtraumas auf das Fas/sFasL-Systems und dessen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen in der Lunge zu ermitteln, wurde das etablierte Thoraxtraumamodell der Ratte genutzt [85,87,178]. Auch für die Bestimmung der Auswirkungen des stumpfen Thoraxtraumas auf die Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen wurde dieses Modell eingesetzt.

Zusammenfassend kann aus den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten eine Aktivierung des Fas/FasL-Systems durch die Induktion eines Thoraxtraumas festgestellt werden. Diese zeigte sich in der erhöhten Abgabe von Fas-Ligand durch die Alveolarmakrophagen und einer Herabsetzung der Anzahl von Fas und Fas-Ligand auf der Oberfläche der Alveolarmakrophagen. Eine konzentrationsabhängige Apoptose induzierende Wirkung konnte von löslichem Fas-Ligand auf Alveolar-Typ 2 Epithelzellen nachgewiesen werden. Dagegen bewirkte löslicher Fas-Ligand auf Alveolarmakrophagen eine verstärkte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen.

Durch die Induktion eines Thoraxtraumas konnte eine Erhöhung der Efferozytose-Aktivität der Alveolarmakrophagen *in vitro* gegenüber apoptotischen Alveolar-Typ 2 Epithelzellen festgestellt werden. Die Aufnahme von apoptotischen neutrophilen Granulozyten wurde nur nach zusätzlicher Stimulation mit PMA gesteigert. Durch die Interaktion mit apoptotischen Zellen wurde die pro-inflammatorische Reaktion der Alveolarmakrophagen nach einem Thoraxtrauma abgeschwächt. Die Aufnahme von opsonierten Latexpartikeln nach Thoraxtrauma war *in vitro* nur tendenziell erhöht. Hingegen konnte nach Instillation von opsonierten Latexpartikeln in die Lunge *in vivo* eine verminderte Aufnahme der Partikel durch Alveolarmakrophagen nach Thoraxtrauma nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte ein Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine in der bronchoalveolären Lavage nachgewiesen werden.

Auch die Fractalkine-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage stiegen nach induziertem Thoraxtrauma an. Dagegen waren die Konzentrationen von Surfactant-Protein-A

und -D nach einem Thoraxtrauma in der bronchoalveolären Lavage deutlich geringer als die in bronchoalveolärer Lavage aus Kontrolltieren.
Die Untersuchung der Auswirkungen einer posttraumatischen Inhalation von Schwefelwasserstoff auf die Efferozytose-Aktivität der Alveolarmakrophagen zeigte nur einen minimal hemmenden Effekt des Gases.
Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse in einzelnen Kapitel diskutiert.

4.1 Die Rolle der Fas/FasL-Expression von Alveolar-Typ 2 Epithelzellen (AT2-Zellen) und Alveolarmakrophagen (AMΦ) nach Thoraxtrauma

Die Alveolar-Typ 2 Epithelzellen spielen als Vorläuferzellen der Alveolar-Typ 1 Epithelzellen und als Speicher- und Syntheseort von Surfactant eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase der Lunge [14,53,201]. In früheren Untersuchungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass es nach einem stumpfen Thoraxtrauma zu einer Reduktion der Zahl an vitalen Alveolar-Typ 2 Epithelzellen im Alveolarepithel durch Apoptose kommt [178]. Parallel zum dort nachgewiesenen Anstieg der Aktivität der Initiator-Caspase 8 in den Alveolar-Typ 2 Epithelzellen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit schon früh nach dem Thoraxtrauma eine Funktionseinschränkung der Alveolar-Typ 2 Epithelzellen. Bereits 6 Stunden nach Induktion des Traumas sanken die Surfactant-Protein-A- und SP-D-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage ab. Diese Reduktion kann nicht nur zur Verminderung der Phagozytose von apoptotischen Zellen oder Mikroorganismen durch Alveolarmakrophagen führen [194,204,205] (s.u.); die eingeschränkte Produktion von Surfactant-Protein-A kann darüberhinaus zur Hemmung der Wiederaufnahme überschüssigen Surfactants bzw. der Hauptkomponente Dipalmitoylphosphatidylcholin der Phospholipide aus der BAL durch die Alveolar-Typ 2 Epithelzellen führen [88]. Hierzu konnte bereits Obertacke et al. eine durch Kontusion der Lunge hervorgerufene Einschränkung der Surfactant-Funktion nachweisen [138].
Die hier nachgewiesene Apoptose induzierende Wirkung von Fas-Ligand auf Alveolar-Typ 2 Epithelzellen lässt darauf schließen, dass löslicher Fas-Ligand, der in der bronchoalveolären Lavage zu allen Zeitpunkten nach Thoraxtrauma signifikant erhöht nachgewiesen werden konnte [178], als Induktor der Apoptose in den Alveolar-Typ 2 Epithelzellen fungiert. Bereits Mizuta et al. beschrieben, dass von Alveolarmakrophagen abgegebener Fas-Ligand die Fas-bedingte Apoptose in Lungenepithelzellen hervorrufen kann [127]. Um den Beitrag der Alveolarmakrophagen zur Auslösung der extrinsischen Apoptose-Kaskade in den Alveolar-Typ 2 Epithelzellen über Fas

zu ermitteln, wurde Fas-Ligand auf der Zelloberfläche, die Fas-Ligand-mRNA-Expression und die Konzentrationen von löslichem Fas-Ligand in Kulturüberständen von Alveolarmakrophagen nach Thoraxtrauma analysiert. Die früh nach dem Thoraxtrauma in den Kulturüberständen der Alveolarmakrophagen nachgewiesene erhöhte Abgabe des löslichen Fas-Ligand-Proteins steht im Einklang mit einem frühen Anstieg von Fas-Ligand-mRNA in den Alveolarmakrophagen. Auch die Reduktion von Fas-Ligand auf der Alveolarmakrophagenoberfläche deutet auf eine gesteigerte Abspaltung von Fas-Ligand in die bronchoalveoläre Lavage hin. Durch die Wirkung von Metalloproteinasen, wie dem konstitutiv von Alveolar-Typ 2 Epithelzellen exprimierten ADAM10 [38] oder den Matrix-Metalloproteinasen MMP 3 und MMP 7, kommt es zur Abspaltung der membrangebundenen Form von Fas-Ligand und somit zur Bildung des löslichem Fas-Ligand [131,172,121,207]. Auch nach LPS-Stimulation konnte von Mizuta et al. eine Steigerung der Abgabe von löslichem Fas-Ligand durch monozytäre Zellen nachgewiesen werden [127]. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann als Quelle der hohen Konzentration an löslichem Fas-Ligand in der BAL [178] die Alveolarmakrophagen-Population angenommen werden.

Die durchflusszytometrische Analyse von Fas auf der Oberfläche der Alveolarmakrophagen zeigte, dass Fas konstitutiv exprimiert wird. Diese grundlegende Expression entspricht den Angaben von Matute-Bello et al. [122]. Die in Alveolarmakrophagen frühzeitig nach Thoraxtrauma auftretende Abnahme sowohl der Fas-mRNA- als auch der Fas-Protein-Expression auf der Oberfläche, könnte eine selbstregulierende Schutzfunktion gegen eine autokrine Induktion der Apoptose in den Alveolarmakrophagen durch löslichen FasL darstellen. Der anschließende Anstieg der Fas-mRNA-Expression in den Alveolarmakrophagen spiegelt sich nicht auf der Zelloberfläche in Form des Fas-Proteins wider. Dies könnte auf eine Internalisierung des Fas-Proteins nach Kontakt mit dem in der bronchoalveoläre Lavage vorliegenden löslichen Fas-Liganden zurückzuführen sein [26,109] oder auf die Abgabe des Fas-Proteins als lösliches Protein in den bronchoalveolären Raum [28,191].

Bei Alveolar-Typ 2 Epithelzellen konnte bereits Fine et al. auf der Oberfläche einer Subpopulation unbehandelter Mäuse Fas-Proteine immunhistochemisch nachweisen [51]. In Untersuchungen humaner Epithelzellen der Bronchiolen von Nakamura et al. zeigte sich ebenfalls eine konstitutive Fas-mRNA-Expression, die mit konstitutiver Fas-Protein-Expression auf der Oberfläche der Zellen korrelierte [132]. Auch in dieser Studie exprimierten ca. 50 Prozent der isolierten vitalen Alveolar-Typ 2 Epithelzellen das Fas-Protein auf ihrer Zelloberfläche. Durch die Induktion eines Thoraxtraumas wurde dieser

prozentuale Anteil an Fas-positiven Alveolar-Typ 2 Epithelzellen nicht verändert. Dagegen wurde die Fas-mRNA-Expression in Alveolar-Typ 2 Epithelzellen früh nach dem Thoraxtrauma hochreguliert, was auf die vermehrt in der bronchoalveolären Lavage nachweisbaren pro-inflammatorischen Zytokine zurückzuführen ist. Durch Präinkubation mit TNF-α und IFN-γ konnte ein Anstieg der Fas-Expression von Hagimoto et al. in humanen bronchiolären Epithelzellen induziert werden [66]. Die Diskrepanz zwischen der Fas-Protein-Expressions- und der Fas-mRNA-Expressions-Änderung könnte ähnlich wie bei den Alveolarmakrophagen darauf zurückzuführen sein, dass es nach der Interaktion des Fas-Proteins mit dem nach Thoraxtrauma vermehrt (s.o.) vorkommenden löslichen Fas-Liganden zur Internalisierung des Fas-Proteins kommt und dies daher nicht mehr auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden kann [26,109]. Auch die Abgabe des Fas-Proteins als löslicher Rezeptor könnte den Anstieg von Fas auf RNA-Ebene in den Alveolar-Typ 2 Epithelzellen erklären [28,191]. Nach minimalen Schwankungen der FasL-mRNA-Expressionen in den Alveolar-Typ 2 Epithelzellen 4 und 16 Stunden nach dem Thoraxtrauma wurde 24 Stunden nach Thoraxtrauma ein signifikantes Absinken der FasL-mRNA-Expression auf ein Drittel der Expression in Alveolar-Typ 2 Epithelzellen der Kontrolltiere nachgewiesen. Der, in vorhergehenden Studien nachgewiesene, kontinuierliche Anstieg der Fas-Ligand-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage [178] über 48 Stunden kann somit nicht auf die Alveolar-Typ 2 Epithelzellen zurückgeführt werden. Die Abnahme der FasL-mRNA-Expression stellt somit eine regulative Antwort der Alveolar-Typ 2 Epithelzellen auf den ansteigenden Fas-Ligand-Spiegel im bronchoalveolären Kompartiment dar. Im Gegensatz zu Nakamura et al., die auf humanen Epithelzellen des Bronchoalveolarraums keine konstitutive FasL-Protein-Expression nachweisen konnten [132], wurde hier auch auf der Zelloberfläche der Alveolar-Typ 2 Epithelzellen der Kontrolltiere FasL nachgewiesen.

4.2 Die Bedeutung von löslichem Fas-Ligand für das posttraumatische inflammatorische Geschehen in der Lunge

Der Beitrag von löslichem Fas-Ligand an der Inflammationsreaktion nach stumpfem Thoraxtrauma wurde anhand isolierter Alveolarmakrophagen und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen untersucht. Dazu wurden Alveolarmakrophagen und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen aus Traumatieren und Kontrolltieren isoliert und mit löslichem Fas-Ligand koinkubiert. Die Fähigkeit des eingesetzten löslichen Fas-Liganden, Apoptose auszulösen, wurden ebenfalls in beiden Zelltypen überprüft.

Die bereits durch das Thoraxtrauma induzierte erhöhte Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 durch Alveolarmakrophagen wurde durch die Stimulation mit löslichem Fas-Ligand zusätzlich erhöht. Zusammen mit der nachgewiesenen Reduktion des anti-inflammatorischen IL-10 durch die Stimulation mit löslichem Fas-Ligand zeigten diese Ergebnisse die pro-inflammatorische Wirkung, welche löslicher Fas-Ligand über die Bindung an Fas auf Alveolarmakrophagen ausübt. Ähnliches konnten Park et al. in unbehandelten humanen Monozyten und MDM (monocyte derived macrophages) beobachten. Die Fas-Aktivierung erfolgte hierbei durch den Fas-aktivierenden Antikörper CH-11 und führte ebenfalls zu einer pro-inflammatorischen Reaktion der mononukleären Zellen, allerdings in Form einer erhöhten TNF-α und IL-8-Abgabe [143]. Durch die Injektion von Fas-Ligand exprimierenden Zellen in die Peritonealhöhle konnten auch Umemura et al. zeigen, dass es über die Ligation von zellgebundenen FasL an Fas zur Induktion einer vermehrten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1β und auch IL-6, IL-17, IL-18 kommt [202].

Der lösliche Fas-Ligand führte bei keiner der in der Zellkultur eingesetzten Konzentrationen zur Erhöhung der Apoptoserate der Alveolarmakrophagen. Vielmehr blieb der Anteil an apoptotischen Alveolarmakrophagen in der Zellkultur bei ca. 10 Prozent. Bereits Park et al. beschrieben die unterschiedliche Aktivierbarkeit verschiedener monozytärer Zellen durch löslichen Fas-Ligand [143]. Die Autoren schlossen dabei auf eine reifungsabhängige Fas-Signaltransduktion. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Fas-Ligation auf Monozyten zur Apoptose-Induktion und begleitender Zytokinfreisetzung kommt. Aus Monozyten differenzierte Makrophagen reagieren auf die Ligation von Fas mit Fas-Ligand ebenfalls mit der Sekretion von pro-inflammatorischer Zytokine, jedoch kommt es nicht zur Apoptose-Induktion [143]. Während die Fas induzierte Zytokinfreisetzung der Monozyten durch Caspase-Inhibitoren hemmbar ist, ist sie bei Makrophagen caspaseunabhängig [143]. Dieser nicht Apoptose induzierende Effekt der Fas-Ligation konnte bei vielen Zellen nachgewiesen werden und wurde bei Ahn et al. mit einer möglichen Verschiebung des Verhältnisses von cFLIP zu Caspase zugunsten von cFLIP nach der Ligation von löslichem FasL an Fibroblasten erklärt [5]. Lee et al. führten die Inhibition des Apoptose-Signalwegs nach Fas-Ligation ebenfalls auf den Death-Inducing Signaling Complex (DISC) zurück [109]. Die Internalisierung vieler nach Fas-Ligation entstandener DISCs in die Zelle führt danach zur Aktivierung des Apoptose-Signalwegs. Kommt es zur Fas-Ligation ohne anschließende Internalisierung der DISCs werden die nichtapoptotischen Signalwege aktiviert [109]. Matsumoto et al. beschreiben ebenso die durch Fas-Ligation induzierte Produktion des auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkenden IL-8 durch HEK293-Zellen als einen

Caspase 8-, FADD-, JNK (c-Junc N-terminale Kinase)- und AP-1 (Activator-protein 1)-abhängigen Prozess [120].

Bei Alveolar-Typ 2 Epithelzellen konnte, ähnlich wie bei den Alveolarmakrophagen, eine durch das stumpfe Thoraxtrauma hervorgerufene Aktivierung und eine signifikant erhöhte Sekretion von IL-6, und MCP-1 nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Alveolarmakrophagen konnte hier jedoch keine weitere Erhöhung der Zytokinkonzentrationen im AT2-Zellkulturüberstand durch eine zusätzliche Stimulation mit löslichem Fas-Ligand nachgewiesen werden. Da weder in Kulturüberständen von Alveolar-Typ 2 Epithelzellen aus kontrollbehandelten Tieren noch in Kulturüberständen von Alveolar-Typ 2 Epithelzellen aus traumatisierten Tieren eine Veränderung der Zyokinkonzentrationen durch Zugabe des löslichen Fas-Ligand nachzuweisen war, ist anzunehmen, dass die Zytokinsekretion der Alveolar-Typ 2 Epithelzellen auch im alveolären Raum nicht von den steigenden Konzentrationen an löslichem Fas-Ligand beeinflußt wird. Im Gegensatz dazu konnte von Hagimoto et al. ein Anstieg der IL-8-Konzentrationen im Kulturüberstand humaner Bronchialepithelzellen nach Stimulation mit TNF-α oder dem Fas-aktivierenden Antikörper CH-11 nachgewiesen werden [66].

Interessanterweise konnte mit dem eingesetzten Fas-Ligand in den AT2-Zell-Kulturen die Apoptoserate signifikant erhöht werden. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Matute-Bello et al. und Mizuta et al. überein. Diese haben den löslichen Fas-Ligand als Auslöser für die Apoptose im Lungenepithel bei ARDS nachgewiesen [123,127]. Ma et al. konnte in Alveolar-Typ 2 Epithelzellen aus der Ratte durch die Stimulation mit Fas-Ligand sowohl Apoptose als auch eine erhöhte Freisetzung von MCP-1 und TNF-α induzieren [119]. Die biologische Aktivität von Fas-Ligand wird von der molekularen Struktur bestimmt [76]. Dabei bestimmt das n-terminale Ende des löslichen Fas-Liganden und das Ausmaß der Oxidation des Methioninrests die Effektivität.

Kritisch hinterfragt werden muss, ob die Fähigkeit dieses rekombinanten löslichen Fas-Ligand, Apoptose bzw. Immunreaktionen zu induzieren, auch der Wirkung des physiologischen Fas-Liganden entspricht. Algeciras-Schimnich et al. haben beim Vergleich von kommerziell erhältlichen Anti-CD95-Lösungen mit physiologischem löslichen und membrangebundenen Fas-Ligand eine stärkere apoptotische Wirkung der meist an Proteine bzw. Peptidsequenzen gebundenen kommerziellen Fas-Liganden nachgewiesen [7]. Da jedoch unterschiedliche Effekte des eingesetzten löslichen Fas-Liganden auf beiden Zelltypen nachzuweisen waren, ist davon auszugehen, dass die Modifikation des eingesetzten Fas-Liganden durch die angehängte Polypeptidsequenz des FLAG-tags keine Auswirkungen

auf das Wirkungsspektrum hat. Verschiedene apoptoseunabhängige Reaktionen auf die Ligation an den Fas-Rezeptor in unterschiedlichen Zellen bzw. unterschiedlicher Zellstadien wurden von Peter et al. diskutiert [152]. So kann in aktivierten T-Zellen die Differenzierung und Proliferation über Fas-Ligation angeregt werden [91,224]. In den konstitutiv stark Fas exprimierenden Leberzellen wird bei viraler Hepatitis und Leberzirrhose Apoptose über Fas induziert [27,65,101,103]. Dagegen führt die Injektion des Anti-Fas Antikörper Jo-2 nach partieller Hepatoektomie zu einer beschleunigten Leberregeneration [37].

Die Ergebnisse des ersten Teils der Arbeit zeigen eine deutliche Aktivierung des Fas/FasL-Systems im bronchoalveolären Kompartiment durch die Induktion eines Thoraxtraumas. Alveolarmakrophagen können durch die Abgabe von löslichem Fas-Ligand die Konzentration dieses Mediators im Bronchoalveolarraum mitzubestimmen. Da sie durch applizierten Fas-Liganden zu einer pro-inflammatorischen Antwort stimuliert werden, ist davon auszugehen, dass *in vivo* diese Wirkung auch autokrin durch den abgegebenen löslichen Fas-Liganden induziert wird. Aufgrund der starken Zunahme der Konzentration von löslichem Fas-Ligand in der bronchoalveolären Lavage nach einem Thoraxtrauma kann man davon ausgehen, dass wenigstens teilweise die pro-inflammatorische Reaktion in der Lunge auf den von Alveolarmakrophagen abgegebenen löslichen Fas-Liganden zurückzuführen ist. In Alveolar-Typ 2 Epithelzellen kommt es hingegen durch den applizierten Fas-Liganden zur Apoptose. Eine zusätzliche pro-inflammatorische Aktivierung konnte in dieser Zellpopulation nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Aktivierung des Fas/Fas-Ligand-Systems durch ein Thoraxtrauma nicht nur zur Apoptose-Induktion in den Alveolar-Typ 2 Epithelzellen führt, sondern auch als immunregulatorischer Faktor die Entzündungsreaktion der Lunge mitbestimmt.

4.3 Phagozytose bzw. Efferozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen nach Thoraxtrauma

Gegenstand dieses Teils der Studie war es, den Einfluss eines stumpfen Thoraxtraumas auf die Phagozytose- bzw. Efferozytosefähigkeit der Alveolarmakrophagen (AMΦ) und die damit verbundene Sekretion unterschiedlicher Entzündungsparameter zu untersuchen. Dabei hat sich gezeigt, dass nur ein relativ geringer Anteil (3-12 %) der Alveolarmakrophagen-Population gegenüber apoptotischen Zellen und gegenüber Latexpartikeln phagozytotisch aktiv war. Diese Beobachtung stimmt mit denen von Hu et al. [80] überein. Diese verglichen die Efferozytose-Aktivität von Alveolarmakrophagen und Peritonealmakrophagen anhand der

Ingestion von apoptotischen Thymozyten. Hierbei konnten sie einen Anteil von 6-28 % phagozytotisch aktiven Alveolarmakrophagen im Gegensatz zu 90 % phagozytotisch aktiven Peritonealmakrophagen nachweisen [80].

Nach Thoraxtrauma kommt es zu einer starken Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge [146,111,147]. Um eine Akkumulation dieser allmählich apoptotisch werdenden neutrophilen Granulozyten und eine durch deren sekundäre Nekrose induzierte Zerstörung des Lungenepithels [114] zu verhindern, müssen sie zeitnah durch Alveolarmakrophagen beseitigt werden [31]. Auch die nach einem Thoraxtrauma vermehrt auftretenden apoptotischen Alveolar-Typ 2 Epithelzellen [178] müssen durch sie umgebende Zellen oder professionelle Phagozyten wie die Alveolarmakrophagen beseitigt werden. Daher sollten die Auswirkungen eines Thoraxtraumas auf die Fähigkeit der Alveolarmakrophagen, apoptotische Zellen zu eliminieren, untersucht werden. Dazu wurden Alveolarmakrophagen aus Trauma- und Kontrolltieren mit apoptotischen neutrophilen Granulozyten und apoptotischen Alveolar-Typ 2 Epithelzellen inkubiert. In den neutrophilen Granulozyten und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen wurde Apoptose durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UV-C) und somit durch direkte DNA-Schädigung [15,210] über den intrinsischen Signalweg induziert.

Die entnommenen Alveolarmakrophagen wiesen grundsätzlich eine unterschiedlich starke Affinität gegenüber den beiden apoptotischen Zellpopulationen auf. Der Anteil an Efferozytose-positiven Zellen war bei Alveolarmakrophagen, die mit apoptotischen Alveolar-Typ 2 Epithelzellen koinkubiert wurden, fast doppelt so hoch, als bei Alveolarmakrophagen, welchen apoptotische neutrophile Granulozyten zur Ingestion zugesetzt wurden. Dies ist möglicherweise auf eine der Entnahme der Alveolarmakrophagen in der Lunge vorangegangene Interaktion von Alveolarmakrophagen mit apoptotischen neutrophilen Granulozyten zurückzuführen. Durch die Ingestion der nach dem Thoraxtrauma anfallenden neutrophilen Granulozyten könnte es zur „Sättigung“ der Alveolarmakrophagen gekommen sein. So kommt es laut Erwig et al. bei Knochenmarksmakrophagen zu einer Reduktion der Aufnahmekapazität von apoptotischen neutrophilen Granulozyten auf ca. 50 Prozent, wenn eine Ingestion von neutrophilen Granulozyten vorangegangen ist [44]. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass diese „Sättigung“ zellspezifisch sein könnte. Ohne PMA-Stimulation konnte nur in Alveolarmakrophagen, die zwei Stunden nach Thoraxtrauma isoliert und mit apoptotischen Zellen inkubiert wurden, eine Steigerung der Efferozytoseaktivität durch das Thoraxtrauma nachgewiesen werden. Unter den im Kulturüberstand untersuchten Zytokinen wurde für TNF-α eine Efferozytose fördernde Wirkung nachgewiesen [44,160]. Der leichte Anstieg der TNF-α-Konzentration in den

Kulturüberständen der Alveolarmakrophagen nach Thoraxtrauma könnte sich somit auch auf die Efferozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen ausgewirkt haben.

Der durch das Thoraxtrauma hervorgerufene Effekt auf die Ingestion apoptotischer Alveolar-Typ 2 Epithelzellen scheint durch PMA-Stimulation aufgehoben zu werden. So war durch Stimulation mit PMA eine generelle Erhöhung des prozentualen Anteils an Alveolarmakrophagen, die apoptotische Alveolar-Typ 2 Epithelzellen aufnehmen, festzustellen. Diese Steigerung der Efferozytose-Aktivität durch PMA konnte von Hu et al. auf die Aktivierung von PKC zurückgeführt werden [79]. Die Interaktion von Phosphatidylserin mit dem Phosphatidylserinrezeptor bewirkt dabei die Aktivierung der zu den klassischen cPKC gehörenden Isoform PKC β II [195]. Dagegen war die Efferozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen gegenüber apoptotischen neutrophilen Granulozyten nahezu unverändert. Nur 24 Stunden nach Thoraxtrauma konnte bei PMA stimulierten Alveolarmakrophagen eine signifikante Steigerung der Efferozytose nachgewiesen werden. Die verstärkte Aufnahme von apoptotischen neutrophilen Granulozyten ist möglicherweise auch auf die Wirkung von PMA auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen zurückzuführen [33]. So werden die durch ein Thoraxtrauma vermehrt einwandernden Monozyten [177] durch die Stimulation von PMA zur Differenzierung zu den stärker phagozytierenden Alveolarmakrophagen [89] angeregt. Eine positive regulierende Wirkung von PMA auf die Expression der unterschiedlichen, für die Efferozytose relevanten Rezeptoren auf der Alveolarmakrophagen-Oberfläche wäre ein anderer Erklärungsansatz.

4.4 Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen *in vivo*

Im Gegensatz zum *in vitro*-Versuch, in dem erst nach 48 Stunden eine Änderung der Phagozytoseaktivität gegenüber Latexpartikel durch das Thoraxtrauma festgestellt werden konnte, kam es bei der Instillation von opsonierten Latexpartikeln in die Lunge 24 Stunden nach Thoraxtrauma zu einer signifikanten Reduktion der Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen. Dieser Unterschied zwischen *in vitro*- und *in vivo*- Ansatz könnte auf den Einfluss des umgebenden Milieus zurückzuführen sein. So kann oxidativer Stress, wie er nach Thoraxtrauma beschrieben wird [63], die Phagozytoseaktivität beeinflussen. Alveolarmakrophagen, die unter hyperoxischen Bedingungen kultiviert wurden, und Alveolarmakrophagen, die aus Tieren isoliert wurden, die unter hyperoxischen Bedingungen gehalten wurden, zeigen eine geringere Phagozytoseaktivität als Alveolarmakrophagen aus normoxischer Kultur bzw. aus normoxisch gehaltenen Tieren [136]. Bei Sauerstoffentzug

zeigten RAW 264.7 Makrophagen gesteigerte Phagozytoseaktivität gegenüber Bakterien [8]. Durch die teilweise Minderbelüftung der Alveolen nach einem Thoraxtrauma kommt es zu Ausbildung hypoxischer, aber auch hyperkapnischer Areale in der Lunge. Im Gegensatz zu hypoxischen Bedingungen konnte jedoch für hyperkapnischen Bedingungen eine Einschränkung der Phagozytoseaktivität nachgewiesen werden [135,211]. Die Phagozytose von opsonierten Partikeln und von hitzeinaktivierten Bakterien (*St. aureus*) durch humane Alveolarmakrophagen sowie THP-1 Makrophagen wurde durch hyperkapnischen Kulturbedingungen (20 % CO_2) reduziert [211]. Auch O'Croinin et al. konnten in den Lungen unter hyperkapnischen Bedingungen gehaltener Ratten nach intratrachealer Instillation von *E. coli* ein Anstieg der Bakterienzahl, stärkere strukturelle Lungenschäden und eine geringere Compliance als in normokapnischen Tieren nachweisen [135].

Ein anderer Grund für die Abnahme der Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen nach Thoraxtrauma gegenüber Latexpartikeln *in vivo* könnte die signifikant verringerte Konzentration von Surfactant-Protein A im bronchoalveolären Kompartiment nach Thoraxtrauma sein. Der phagozytosefördernde Effekt [194,204] dieses hydrophilen Collectins wird somit reduziert. Surfactant-Protein A bewirkt in den Alveolen die Expression von CR3 auf der Oberfläche von Alveolarmakrophagen und bestimmt somit die Komplement vermittelte Phagozytose [62]. Außerdem stimuliert Surfactant-Protein A die Phagozytose opsonierter Latexpartikel über die Fcγ-Rezeptoren [216]. Somit könnte die verminderte Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen 24 Stunden nach Thoraxtrauma auf die zum selben Zeitpunkt stark reduzierte Konzentration von Surfactant-Protein A zurückzuführen sein. Die Konzentrationen des ebenfalls positiv auf die Phagozytose wirkenden Surfactant-Protein D sind bereits sechs Stunden nach Thoraxtrauma reduziert. Die Anlagerung von Surfactant-Protein D an IgG, führt wie auch das Surfactant-Protein A zur Aggregation der IgG-beschichteten Partikel und zu einer verstärkten Aufnahme durch Makrophagen [113,130,216]. Beide Bestandteile des Surfactant, Surfactant-Protein A und D, werden in den Alveolar-Typ 2 Epithelzellen synthetisiert und in den Alveolarraum abgegeben. Raghavendran et al. konnte nach Thoraxtrauma eine veränderte Zusammensetzung des Surfactants und eine damit einhergehende Dysfunktion des Surfactants beschreiben [154]. Ein zusätzlicher Verdünnungseffekt könnte durch das nach Thoraxtrauma entstehende Ödem [177] die Wirkung der Surfactant-Proteine einschränken.

Der Rückgang an Surfactant Proteinen durch die Reduktion der Alveolar-Typ 2 Epithelzellen nach Thoraxtrauma durch Apoptose [178] und die posttraumatisch in der Lunge auftretenden

hyperkapnischen Bedingungen könnten die Minderung der Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen begründen.

4.5 Auswirkungen der Phagozytose bzw. Efferozytose auf die Zytokin-Sekretion der Alveolarmakrophagen nach Thoraxtrauma

Die pro-inflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1β konnten in den Kulturüberständen der Alveolarmakrophagen, die nach Thoraxtrauma isoliert und mit Latexpartikel versetzt wurden, wie auch in den Kulturüberständen, die nur mit Medium inkubiert wurden, 24 Stunden nach Thoraxtrauma in stark erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu kam es in Gegenwart von apoptotischen Zellen zur Reduktion der Freisetzung dieser pro-inflammatorischen Zytokine. Damit übereinstimmend wurde von Byrne et al., Voll et al. und Fadok et al. beschrieben, dass es bei LPS-stimulierten Makrophagen und Monozyten zu dieser Sekretionshemmung der beiden Zytokine nach Ingestion von apoptotischen Zellen kommt [23,47,208]. Die stärkere Hemmung der Sekretion dieser beiden Zytokine bei der Ingestion von apoptotischen neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur Ingestion von apoptotischen Alveolar-Typ 2 Epithelzellen könnte auf die unterschiedliche Anzahl an zugegebenen apoptotischen Zellen zurückführen sein. Denkbar wäre auch eine unterschiedliche Expressionsdichte von Phosphatidylserin auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen bzw. Zellfragmente, die wie Huynh et al. beschreiben, ausschlaggebend für die Induktion der TGF-β-Sekretion nach Efferozytose ist [83]. Das anti-inflammatorische IL-10 konnte nur in den Kulturüberständen der Alveolarmakrophagen mit Medium ohne Zusätze nachgewiesen werden. In den Kulturüberständen mit zugesetzten apoptotischen Zellen wie auch in den Kulturüberständen mit zugesetzten Latexpartikeln sanken die Konzentrationen von IL-10 unter die Nachweisgrenze. Eine Reduktion der IL-10-Sekretion nach Ingestion von apoptotischen neutrophilen Granulozyten wurde auch bei LPS-stimulierten Makrophagen beschrieben [47]. Byrne et al. und Voll et al. konnten dagegen in Kulturüberständen von LPS-stimulierten Monozyten eine Steigerung der IL-10-Sekretion nach Ingestion von apoptotischen Zellen nachweisen [23,208]. So kann bei den nach Thoraxtrauma entnommenen Alveolarmakrophagen, nur von einer tendenziell anti-inflammatorischen Wirkung der Efferozytose gesprochen werden, da die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokine wie TNF-α, IL-1β und IL-6 zwar eingeschränkt wurde, das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 jedoch nicht verstärkt sondern auch eingeschränkt abgegeben wurde. Die Regulation erfolgt möglicherweise über das, nach Fadok et al. und Huynh et al. bei der Ingestion apoptotischer Zellen der myeloiden Reihe durch LPS-stimulierte

Makrophagen ebenfalls verstärkt freigesetzte TGF-β1 [47,83]. Hierbei wird über den TGF-β-Signalweg die TGF-β-activated kinase 1 (TAK1) in der Zelle aktiviert. Dieses aktiviert ihrerseits über IKKβ NFκB und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Inflammationsantwort [184].

Ähnlich wie bei den oben genannten Zytokinen kommt es in den Kulturüberständen der Alveolarmakrophagen, die 24 Stunden nach Thoraxtrauma entnommen wurden, zu einer starken Konzentrationserhöhung der CCL-Chemokine MIP-1α und MCP-1 und des CXC-Chemokins CINC-1. Durch die Zugabe von apoptotischen neutrophilen Granulozyten wird dieser Anstieg zwischen dem 2 Stunden- und 24 Stunden-Zeitpunkt aufgehoben. Auch hier zeigte sich ein geringerer Effekt nach Zugabe apoptotischer Alveolar-Typ 2 Epithelzellen. Somit führt eine geringere Anzahl an apoptotischen Zellen (5 apoptotische PMN auf 1 AMΦ vs. 8 apoptotische Alveolar-Typ 2 Epithelzellen auf 1 AMΦ) zu einer deutlicheren Minderung der Zytokinsekretion. Da es sich bei CINC-1, MIP-1α und MCP-1 um Zytokine mit chemotaktischer Wirkung auf neutrophile Granulozyten handelt [155,213,220,188], könnte durch deren Hemmung nach der Ingestion apoptotischer neutrophiler Granulozyten eine zusätzliche Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die durch das Thoraxtrauma geschädigte Lunge verhindert werden. Dies scheint auf eine differenzierte Antwort der Zytokinsekretion der Alveolarmakrophagen auf die Efferozytose unterschiedlicher apoptotischer Zelltypen hinzudeuten. Ähnliches konnten Kurosaka et al. beim Vergleich der MIP-2-Sekretion von Makrophagen nach Kokultur mit apoptotischen CTLL-2-Zellen und apoptotischen Thymozyten beobachten [105].

In den Kulturüberständen der zwei Stunden nach Thoraxtrauma isolierten Alveolarmakrophagen mit zugesetzten apoptotischen neutrophilen Granulozyten, konnte eine signifikant höhere Konzentration von RANTES nachgewiesen werden als in Kulturüberständen von Alveolarmakrophagen, welche apoptotische Alveolar-Typ 2 Epithelzellen aufgenommen hatten. Die Interaktion der Alveolarmakrophagen mit apoptotischen Alveolar-Typ 2 Epithelzellen führt somit zur verminderten RANTES-Sekretion der durch Thoraxtrauma aktivierten Alveolarmakrophagen. RANTES, als chemotaktisch auf mononukleäre Zellen wirkendes Chemokin, induziert die vermehrte Einwanderung von interstitiellen Makrophagen und Monozyten in die Alveolen [169],[206]. Die unterschiedlich starke Reaktion der Alveolarmakrophagen auf die zwei Zelltypen könnte auf ein unterschiedliches Apoptosestadium der Zellen zurückzuführen sein. Kurosaka et al. beschrieben das Fehlen der Zytokinsekretion bei der Aufnahme frühapoptotischer Zellen durch Alveolarmakrophagen [104]. Das Verhältnis der apoptotischen Zellen bzw. die

Expressionsdichte von Phosphatidylserin auf den Zelloberflächen in Relation zur Anzahl an ingestierenden Alveolarmakrophagen wäre ein weiterer Erklärungsansatz der unterschiedlich starken Sekretion von RANTES nach Aufnahme der zwei Zelltypen.

Vergleicht man die Zytokinausschüttung der Alveolarmakrophagen nach der Induktion des Thoraxtraumas und Zugabe von opsonierten Latexpartikeln mit den Konzentrationen der Zytokine in der bronchoalveolären Lavage nach Thoraxtrauma und intratrachealer Instillation von opsonierten Latexpartikeln, so kann man feststellen, dass ein Großteil der Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage stark von der Sekretion durch Alveolarmakrophagen beeinflusst wird [112]. Die in der bronchoalveolären Lavage 24 Stunden nach Thoraxtrauma nachweisbaren Erhöhungen der Konzentrationen der Zytokine TNF-α, MCP-1 und CINC-1 sind in unstimulierten und mit PMA stimulierten Alveolarmakrophagen-Kulturüberständen sowohl mit als auch ohne Zugabe von opsonierten Latexpartikeln ebenfalls nachzuweisen. Auch der frühe Anstieg der Konzentration von RANTES in der bronchoalveolären Lavage spiegelt sich in den Alveolarmakrophagen-Kulturüberständen der unstimulierten Alveolarmakrophagen wider. Im Gegensatz dazu zeigte sich die frühe Reduktion der RANTES-Konzentration in den Alveolarmakrophagen-Kulturüberständen nach Zugabe der Latexpartikel nicht in der bronchoalveolären Lavage nach Instillation der Latexpartikel. Auch der Verlauf der IL-6-Konzentrationen stellte sich in der bronchoalveolären Lavage anders dar als in den Kulturüberständen der Alveolarmakrophagen. Der starke Anstieg der IL-6-Konzentration, der 24 Stunden nach der Thoraxtrauma-Induktion und der Instillation von Latexpartikeln in der bronchoalveolären Lavage nachgewiesen wurde, konnte so in den Alveolarmakrophagen-Kulturüberständen mit zugesetzten Latexpartikeln nicht beobachtet werden. Somit können für RANTES und IL-6 weitere Zelltypen des bronchoalveolären Kompartiments, wie z.B. die Fibroblasten oder die eingewanderten neutrophilen Granulozyten als mindestens ebenbürtige Sekretionsquellen in Erwägung gezogen werden [71,106,217].

4.6 Auswirkungen der posttraumatischen Schwefelwasserstoff-Inhalation auf die Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen

Das in der Studie eingesetzte Schwefelwasserstoff-Expositionsmodell führt bei den exponierten CD-Ratten durch die 6-stündigen H_2S-Exposition in einer Konzentration von 100ppm H_2S zu einer Reduktion der Körpertemperatur und der körperliche Aktivität [176]. Von Blackstone et al. und Volpato et al. konnten vergleichbare Auswirkungen der „suspended animation" durch H_2S-Inhalation auf die Körpertemperatur und Stoffwechselumsatz beobachtet werden [18,209].

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss einer posttraumatischen Schwefelwasserstoff-Exposition auf die Aktivierung der Alveolarmakrophagen zu erfassen. Die direkt nach dem Thoraxtrauma durchgeführte 6-stündige Schwefelwasserstoff-Exposition der CD-Ratten führte noch 48 Stunden nach dem Thoraxtrauma zu einem verminderten Anstieg der Anzahl der Alveolarmakrophagen in der bronchoalveolären Lavage [176]. Faller et al. konnten bereits bei beatmungsinduzierten Lungenverletzungen (ventilator-induced lung injury VILI) durch die inhalative H_2S-Behandlung eine Hemmung der Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Lunge nachweisen [50]. Die von Dufton et al. beobachtete verstärkte Leukozyten-Clearance nach Zymosan induzierter Peritonitis durch die Injektion des H_2S-Donors NaHS [41], zeigte sich sowohl durch die Abnahme der Zahl an neutrophilen Granulozyten (GR-1^{hi}), als auch der myeloiden Zellen (F4/80+) am Entzündungsherd.

Die Auswirkungen von Schwefelwasserstoff auf die Zellmigration werden konträr diskutiert. Während nachgewiesen werden konnte, dass in embryonalen Nierenzellen (HEK293) und humanen Endothelzellen (HUVECs) Schwefelwasserstoff zu verstärkter Polymerisierung des Aktin-Zytoskeletts und erhöhten Migrationsraten führt [129,225], konnten ebenfalls gezeigt werden, dass die Blockade der Schwefelwasserstoff-Synthese zu verstärkter Adhäsion von Leukozyten an das Endothel und zu erhöhtem Infiltrationsvermögen der Leukozyten führt [223]. Eine die Migration hemmende Wirkung von Schwefelwasserstoff auf Monozyten aus dem Blut konnte auch im Rahmen der parallel durchgeführten Studie nachgewiesen werden [176]. Sie zeigte sich in einem reduzierten und zeitlich verkürzten Anstieg der Alveolarmakrophagen-Zahl in der bronchoalveolären Lavage nach Thoraxtrauma. Die Schwefelwasserstoff-Exposition könnte somit zusammen mit der 24 Stunden nach Thoraxtrauma deutlich erniedrigten MCP-1-Konzentration im Plasma die Ursache für die

verminderte Zahl an Alveolarmakrophagen in der BAL 48 Stunden nach dem Thoraxtrauma darstellen [176].

Um eine mögliche Beeinflussbarkeit der Phagozytose-Aktivität der Alveolarmakrophagen durch die inhalative Schwefelwasserstoff-Behandlung zu analysieren, wurden sechs, 24 und 48 Stunden nach Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung Alveolarmakrophagen aus den behandelten CD-Ratten isoliert. Sechs und 24 Stunden nach Thoraxtrauma bzw. Kontrollbehandlung konnten sowohl zwischen Thoraxtrauma- und Kontroll-behandelten Tieren als auch zwischen Raumluft- und H_2S-behandelten Tieren keine Unterschiede zwischen den Phagozytoseraten der isolierten Alveolarmakrophagen festgestellt werden. 48 Stunden nach dem Eingriff scheint sich die Behandlung mit Schwefelwasserstoff stärker auf die Zellen des bronchoalveolären Raumes auszuwirken. Die durch das Thoraxtrauma gesteigerte Phagozytoseaktivität der aus der Lunge Kontrollgas behandelter Tiere entnommener Alveolarmakrophagen wird in diesem Zeitabstand durch eine Schwefelwasserstoff-Behandlung aufgehoben. Dieser minimale Einfluss von Schwefelwasserstoff nach Thoraxtrauma auf die Phagozytose-Aktivität der Alveolarmakrophagen könnte auf die geringe H_2S-Konzentration zurückzuführen sein. Khan et al. konnten erst bei höheren H_2S-Konzentrationen eine Wirkung des Gases auf die Aktivität der Alveolarmakrophagen nachweisen [95]. Dabei wurde die Respirationsrate Zymosan stimulierter Alveolarmakrophagen durch eine 4-stündige H_2S-Exposition der Ratten bei Konzentrationen von 200 und 400 ppm deutlich verringert. Die vorliegende Studie wurde gezielt bei einer Konzentration von 100 ppm H_2S durchgeführt, um die ab Konzentrationen von 200 ppm H_2S auftretenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen zu vermeiden.

5 Zusammenfassung

Das stumpfe Thoraxtrauma ist eine häufige und sehr relevante Komplikation nach Unfällen. Durch eine Beteiligung des Thoraxtraumas beim Polytrauma kommt es zu einer deutlichen Verschlechterung der Prognose [58]. In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte im Ratten- und Mausmodell nachgewiesen werden, dass ein stumpfes Thoraxtrauma sowohl lokale als auch systemische Immunreaktionen induziert [99,147]. Der Konzentrationsanstieg von löslichem Fas-Ligand in der bronchoalveolären Lavage und der Anstieg der Zahl apoptotischer Alveolar-Typ 2 Epithelzellen im Lungenepithel [178] führte zu der Fragestellung, welche Rolle das Fas/Fas-Ligand-System innerhalb der posttraumatischen Immunantwort des bronchoalveolären Kompartiments spielt. Durch die posttraumatisch zunehmende Anzahl apoptotischer Alveolar-Typ 2 Epithelzellen und in die Alveolen rekrutierter, neutrophiler Granulozyten [148] kommt der Beseitigung der apoptotischen Zellen aus dem Bronchoalveolarraum durch Efferozytose eine große Bedeutung zu. Ziel dieser Arbeit war es daher, mögliche Auswirkungen des stumpfen Thoraxtraumas auf die Efferozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen zu ermitteln. Außerdem sollte mittels opsonierten Latexpartikeln untersucht werden, ob das stumpfe Thoraxtrauma zu phagozytären Defiziten der Alveolarmakrophagen führt. Diese könnten zur eingeschränkten Bakterien-Clearance-Rate in der Lunge nach einem stumpfen Thoraxtraumas beitragen [40].

Männliche CD-Ratten wurden einem stumpfen Thoraxtrauma bzw. der Kontrollbehandlung unterzogen, die Alveolarmakrophagen und Alveolar-Typ 2 Epithelzellen isoliert, die Expressionen der Fas- und Fas-Ligand-Proteine auf der Zelloberfläche und die mRNA-Expressionen von Fas und Fas-Ligand bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, dass es nach einem Thoraxtrauma zur gesteigerten Abspaltung von löslichem Fas-Ligand von den Alveolarmakrophagen kommt. Der lösliche Fas-Ligand induzierte in den Alveolarmakrophagen posttraumatisch eine pro-inflammatorische Reaktion, jedoch keine gesteigerte Apoptoserate. Kontär dazu zeigte sich in den Alveolar-Typ 2 Epithelzellen eine Sensitivität gegenüber der Apoptose induzierenden Wirkung von Fas-Ligand, jedoch keine Aktivierung zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Somit stellt nach einem Thoraxtrauma das Fas/Fas-Ligand-System mit der Abgabe des löslichen Fas-Liganden nicht nur einen wichtigen Apoptose-Induktor im Lungenepithel dar, sondern wirkt nach Thoraxtrauma auch als wichtiger regulierender Faktor bei der Entzündungsreaktion der Alveolarmakrophagen.

Zur Durchführung der *in vitro*-Phagozytose-Assays wurden ebenfalls männliche CD-Ratten einem stumpfen Thoraxtrauma unterzogen, die Alveolarmakrophagen mittels bronchoalveolärer Lavage isoliert und mit apoptotischen Zellen oder opsonierten Latexpartikeln koinkubiert. Durch die fluoreszenzmikroskopisch Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Efferozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen früh nach Thoraxtrauma angeregt wird. Durch die Ingestion der apoptotischen Zellen durch aktivierte Alveolarmakrophagen kommt es zur Verminderung der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen und des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Zusammen mit der reduzierten Abgabe chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkender Zytokine konnte somit ein überwiegend anti-inflammatorischer Effekt durch die Aufnahme apoptotischer Zellen in Alveolarmakrophagen festgestellt werden. Im Gegensatz zur Efferozytoseaktivität wurde die Phagozytoseaktivität isolierter Alveolarmakrophagen gegenüber opsonierten Latexpartikel durch ein Thoraxtrauma nicht signifikant beeinflusst. Die Konzentrationen der in die Kulturüberstände abgegebenen Zytokine wurden durch die zusätzliche Interaktion mit zugegebenen Latexpartikeln nicht beeinflusst. Zur Analyse der Phagozytoseaktivität *in vivo* wurden opsonierte Latexpartikel intratracheal instilliert. Der nach der Isolation der Alveolarmakrophagen ermittelte prozentuale Anteil an phagozytierenden Alveolarmakrophagen wurde durch ein Thoraxtrauma deutlich gesenkt. Somit kann angenommen werden, dass die Umgebungsbedingungen, wie z.B. Surfactant-Protein-D, dessen Konzentrationen früh nach Thoraxtrauma in der Lunge herabgesetzt waren, und Surfactant-Protein-A, dessen Konzentrationen spät nach Thoraxtrauma herabgesetzt waren, eine wichtige Rolle bei der Eliminierung opsonierter Partikel durch Alveolarmakrophagen im alveolären Kompartiment spielt. Diese verminderte Reaktionsfähigkeit der Alveolarmakrophagen auf Antigene könnte zur erhöhten Infektanfälligkeit nach Thoraxtrauma beitragen. Um die Auswirkungen der Schwefelwasserstoff induzierten *Suspended Animation* auf die Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen zu untersuchen, wurden männliche CD-Ratten direkt nach der Induktion des Thoraxtraumas 6 Stunden Schwefelwasserstoff exponiert. Die Alveolarmakrophagen wurden isoliert, mit opsonierten Latexpartikeln inkubiert und der prozentuale Anteil an phagozytierenden Alveolarmakrophagen ermittelt. Die 48 Stunden nach Thoraxtrauma nachweisbare Zunahme des Anteils an phagozytierenden Alveolarmakrophagen wurde durch Schwefelwasserstoff aufgehoben. Der in der Literatur kontrovers diskutierte therapeutische Einsatz von Schwefelwasserstoff hatte somit in der inhalativ dargereichten Form nur minimalen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abe K, Kimura H: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J Neurosci 16: 1066-1071 (1996)

2. Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J: Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279: L1137-L1145 (2000)

3. 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 30: 35-42 (1974)

4. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN: Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. J Biol Chem 260: 2345-2354 (1985)

5. Ahn JH, Park SM, Cho HS, Lee MS, Yoon JB, Vilcek J, Lee TH: Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. J Biol Chem 276: 47100-47106 (2001)

6. Akakura S, Singh S, Spataro M, Akakura R, Kim JI, Albert ML, Birge RB: The opsonin MFG-E8 is a ligand for the alphavbeta5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. Exp Cell Res 292: 403-416 (2004)

7. Algeciras-Schimnich A, Pietras EM, Barnhart BC, Legembre P, Vijayan S, Holbeck SL, Peter ME: Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 11445-11450 (2003)

8. Anand RJ, Gribar SC, Li J, Kohler JW, Branca MF, Dubowski T, Sodhi CP, Hackam DJ: Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner. J Leukoc Biol 82: 1257-1265 (2007)

9. Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E: Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. Nat Immunol 4: 87-91 (2003)

10. Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, Mohler W, Han DK: Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. Dev Cell 4: 587-598 (2003)

11. Baker SP, O'Neill B, Haddon W, Jr., Long WB: The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. J Trauma 14: 187-196 (1974)

12. Balasubramanian K, Chandra J, Schroit AJ: Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition. J Biol Chem 272: 31113-31117 (1997)

13. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D: Epidemiologie des Schwerverletzten - eine prospektive Erfassung der präklinischen und klinischen Versorgung. Unfallchirurg 103: 355-363 (2000)

14. Bates SR, Dodia C, Tao JQ, Fisher AB: Surfactant protein-A plays an important role in lung surfactant clearance: evidence using the surfactant protein-A gene-targeted mouse. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294: L325-L333 (2008)

15. Batista LF, Roos WP, Kaina B, Menck CF: p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. Mol Cancer Res 7: 237-246 (2009)

16. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. Nature 385: 640-644 (1997)

17. Berkman N, John M, Roesems G, Jose PJ, Barnes PJ, Chung KF: Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. J Immunol 155: 4412-4418 (1995)

18. Blackstone E, Morrison M, Roth MB: H2S induces a suspended animation-like state in mice. Science 308: 518- (2005)

19. Blackstone E, Roth MB: Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. Shock 27: 370-372 (2007)

20. Borisenko GG, Iverson SL, Ahlberg S, Kagan VE, Fadeel B: Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) binds to oxidized phosphatidylserine: implications for macrophage clearance of apoptotic cells. Cell Death Differ 11: 943-945 (2004)

21. Borregaard N: Development of neutrophil granule diversity. Ann N Y Acad Sci 832: 62-68 (1997)

22. Brieland JK, Jones ML, Clarke SJ, Baker JB, Warren JS, Fantone JC: Effect of acute inflammatory lung injury on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rat pulmonary alveolar macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol 7: 134-139 (1992)

23. Byrne A, Reen DJ: Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. J Immunol 168: 1968-1977 (2002)

24. Casey LC: Role of cytokines in the pathogenesis of cardiopulmonary-induced multisystem organ failure. Ann Thorac Surg 56: S92-S96 (1993)

25. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. J Biol Chem 257: 7847-7851 (1982)

26. Chakrabandhu K, Huault S, Garmy N, Fantini J, Stebe E, Mailfert S, Marguet D, Hueber AO: The extracellular glycosphingolipid-binding motif of Fas defines its internalization route, mode and outcome of signals upon activation by ligand. Cell Death Differ 15: 1824-1837 (2008)

27. Chen L, Park SM, Tumanov AV, Hau A, Sawada K, Feig C, Turner JR, Fu YX, Romero IL, Lengyel E, Peter ME: CD95 promotes tumour growth. Nature 465: 492-496 (2010)

28. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD: Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. Science 263: 1759-1762 (1994)

29. Christman JW, Blackwell TR, Cowan HB, Shepherd VL, Rinaldo JE: Endotoxin induces the expression of macrophage inflammatory protein 1 alpha mRNA by rat alveolar and bone marrow-derived macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol 7: 455-461 (1992)

30. Clarke PG, Clarke S: Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. Anat Embryol (Berl) 193: 81-99 (1996)

31. Cox G, Crossley J, Xing Z: Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. Am J Respir Cell Mol Biol 12: 232-237 (1995)

32. Cui T, Miksa M, Wu R, Komura H, Zhou M, Dong W, Wang Z, Higuchi S, Chaung W, Blau SA, Marini CP, Ravikumar TS, Wang P: Milk fat globule epidermal growth factor 8 attenuates acute lung injury in mice after intestinal ischemia and reperfusion. Am J Respir Crit Care Med 181: 238-246 (2010)

33. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH: The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. PLoS One 5: e8668- (2010)

34. de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 174: 1209-1220 (1991)

35. deCathelineau AM, Henson PM: The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. Essays Biochem 39: 105-117 (2003)

36. Denys A, Udalova IA, Smith C, Williams LM, Ciesielski CJ, Campbell J, Andrews C, Kwaitkowski D, Foxwell BM: Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF-alpha production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF-kappa B in primary human macrophages. J Immunol 168: 4837-4845 (2002)

37. Desbarats J, Newell MK: Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. Nat Med 6: 920-923 (2000)

38. Dijkstra A, Postma DS, Noordhoek JA, Lodewijk ME, Kauffman HF, ten Hacken NH, Timens W: Expression of ADAMs ("a disintegrin and metalloprotease") in the human lung. Virchows Arch 454: 441-449 (2009)

39. Dinarello CA, Cannon JG: Cytokine measurements in septic shock. Ann Intern Med 119: 853-854 (1993)

40. Dolgachev VA, Yu B, Reinke JM, Raghavendran K, Hemmila MR: Host susceptibility to gram-negative pneumonia after lung contusion. J Trauma Acute Care Surg 72: 614-622 (2012)

41. Dufton N, Natividad J, Verdu EF, Wallace JL: Hydrogen sulfide and resolution of acute inflammation: A comparative study utilizing a novel fluorescent probe. Sci Rep 2: 499- (2012)

42. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS: Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. Nature 461: 282-286 (2009)

43. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 391: 43-50 (1998)

44. Erwig LP, Gordon S, Walsh GM, Rees AJ: Previous uptake of apoptotic neutrophils or ligation of integrin receptors downmodulates the ability of macrophages to ingest apoptotic neutrophils. Blood 93: 1406-1412 (1999)

45. Esechie A, Kiss L, Olah G, Horvath EM, Hawkins H, Szabo C, Traber DL: Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. Clin Sci (Lond) 115: 91-97 (2008)

46. 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 22: 142-150 (1975)

47. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM: Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. J Clin Invest 101: 890-898 (1998)

48. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM: Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. J Immunol 149: 4029-4035 (1992)

49. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol 148: 2207-2216 (1992)

50. Faller S, Ryter SW, Choi AM, Loop T, Schmidt R, Hoetzel A: Inhaled hydrogen sulfide protects against ventilator-induced lung injury. Anesthesiology 113: 104-115 (2010)

51. Fine A, Anderson NL, Rothstein TL, Williams MC, Gochuico BR: Fas expression in pulmonary alveolar type II cells. Am J Physiol 273: L64-L71 (1997)

52. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol 147: 3815-3822 (1991)

53. Fisher AB, Dodia C: Lysosomal-type PLA2 and turnover of alveolar DPPC. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 280: L748-L754 (2001)

54. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD: Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. J Exp Med 188: 1413-1419 (1998)

55. Foo RS, Mani K, Kitsis RN: Death begets failure in the heart. J Clin Invest 115: 565-571 (2005)

56. Frevert CW, Huang S, Danaee H, Paulauskis JD, Kobzik L: Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. J Immunol 154: 335-344 (1995)

57. Fuller AD, Van Eldik LJ: MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons. J Neuroimmune Pharmacol 3: 246-256 (2008)

58. Gaillard M, Herve C, Mandin L, Raynaud P: Mortality prognostic factors in chest injury. J Trauma 30: 93-96 (1990)

59. Garcia GE, Xia Y, Chen S, Wang Y, Ye RD, Harrison JK, Bacon KB, Zerwes HG, Feng L: NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. J Leukoc Biol 67: 577-584 (2000)

60. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM: Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. Cell 123: 321-334 (2005)

61. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, Raines EW: Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). J Biol Chem 276: 37993-38001 (2001)

62. Gil M, McCormack FX, LeVine AM: Surfactant protein A modulates cell surface expression of CR3 on alveolar macrophages and enhances CR3-mediated phagocytosis. J Biol Chem 284: 7495-7504 (2009)

63. 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 272: L320-L334 (1997)

64. Graham IL, Gresham HD, Brown EJ: An immobile subset of plasma membrane CD11b/CD18 (Mac-1) is involved in phagocytosis of targets recognized by multiple receptors. J Immunol 142: 2352-2358 (1989)

65. Guy CS, Wang J, Michalak TI: Hepatocytes as cytotoxic effector cells can induce cell death by CD95 ligand-mediated pathway. Hepatology 43: 1231-1240 (2006)

66. Hagimoto N, Kuwano K, Kawasaki M, Yoshimi M, Kaneko Y, Kunitake R, Maeyama T, Tanaka T, Hara N: Induction of interleukin-8 secretion and apoptosis in bronchiolar epithelial cells by Fas ligation. Am J Respir Cell Mol Biol 21: 436-445 (1999)

67. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S: Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. Nature 417: 182-187 (2002)

68. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, Nagata S: Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. Science 304: 1147-1150 (2004)

69. Hanus J, Kalinowska-Herok M, Widlak P: The major apoptotic endonuclease DFF40/CAD is a deoxyribose-specific and double-strand-specific enzyme. Apoptosis 13: 377-382 (2008)

70. Hanus J, Kalinowska-Herok M, Widlak P: Identification of novel putative regulators of the major apoptotic nuclease DNA Fragmentation Factor. Acta Biochim Pol 57: 521-527 (2010)

71. Hawwa RL, Hokenson MA, Wang Y, Huang Z, Sharma S, Sanchez-Esteban J: IL-10 inhibits inflammatory cytokines released by fetal mouse lung fibroblasts exposed to mechanical stretch. Pediatr Pulmonol 46: 640-649 (2011)

72. Heflin AC, Jr., Brigham KL: Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. J Clin Invest 68: 1253-1260 (1981)

73. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, M++ller-Newen G, Schaper F: Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J 374: 1-20 (2003)

74. Helfgott DC, May LT, Sthoeger Z, Tamm I, Sehgal PB: Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts. J Exp Med 166: 1300-1309 (1987)

75. 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 39: 712-719 (1995)

76. Herrero R, Kajikawa O, Matute-Bello G, Wang Y, Hagimoto N, Mongovin S, Wong V, Park DR, Brot N, Heinecke JW, Rosen H, Goodman RB, Fu X, Martin TR: The biological activity of FasL in human and mouse lungs is determined by the structure of its stalk region. J Clin Invest 121: 1174-1190 (2011)

77. Hoff SJ, Shotts SD, Eddy VA, Morris JA, Jr.: Outcome of isolated pulmonary contusion in blunt trauma patients. Am Surg 60: 138-142 (1994)

78. Hortner M, Nielsch U, Mayr LM, Heinrich PC, Haan S: A new high affinity binding site for suppressor of cytokine signaling-3 on the erythropoietin receptor. Eur J Biochem 269: 2516-2526 (2002)

79. Hu B, Punturieri A, Todt J, Sonstein J, Polak T, Curtis JL: Recognition and phagocytosis of apoptotic T cells by resident murine tissue macrophages require multiple signal transduction events. J Leukoc Biol 71: 881-889 (2002)

80. Hu B, Sonstein J, Christensen PJ, Punturieri A, Curtis JL: Deficient In Vitro and In Vivo Phagocytosis of Apoptotic T Cells by Resident Murine Alveolar Macrophages. J Immunol 165: 2124-2133 (2000)

81. Huang S, Paulauskis JD, Godleski JJ, Kobzik L: Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. Am J Pathol 141: 981-988 (1992)

82. Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A: The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. Blood 102: 1186-1195 (2003)

83. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM: Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. J Clin Invest 109: 41-50 (2002)

84. Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K: Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. J Atheroscler Thromb 11: 15-21 (2004)

85. Irwin RJ, Lerner MR, Bealer JF, Brackett DJ, Tuggle DW: Cardiopulmonary physiology of primary blast injury. J Trauma 43: 650-655 (1997)

86. Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K, Nakano T: Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. J Biochem 127: 411-417 (2000)

87. 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 27: 349-356 (1987)

88. Jain D, Dodia C, Bates SR, Hawgood S, Poulain FR, Fisher AB: SP-A is necessary for increased clearance of alveolar DPPC with hyperventilation or secretagogues. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284: L759-L765 (2003)

89. Jennings JH, Linderman DJ, Hu B, Sonstein J, Curtis JL: Monocytes recruited to the lungs of mice during immune inflammation ingest apoptotic cells poorly. Am J Respir Cell Mol Biol 32: 108-117 (2005)

90. Jones ML, Mulligan MS, Flory CM, Ward PA, Warren JS: Potential role of monocyte chemoattractant protein 1/JE in monocyte/macrophage-dependent IgA immune complex alveolitis in the rat. J Immunol 149: 2147-2154 (1992)

91. Kabra NH, Kang C, Hsing LC, Zhang J, Winoto A: T cell-specific FADD-deficient mice: FADD is required for early T cell development. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 6307-6312 (2001)

92. Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, Burdick MD, Kunkel SL: Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. J Exp Med 178: 63-72 (1993)

93. Kashiba M, Kajimura M, Goda N, Suematsu M: From O2 to H2S: a landscape view of gas biology. Keio J Med 51: 1-10 (2002)

94. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239-257 (1972)

95. Khan AA, Yong S, Prior MG, Lillie LE: Cytotoxic effects of hydrogen sulfide on pulmonary alveolar macrophages in rats. J Toxicol Environ Health 33: 57-64 (1991)

96. Kimura H: Hydrogen sulfide as a neuromodulator. Mol Neurobiol 26: 13-19 (2002)

97. Klein U, Laubinger R, Malich A, Hapich A, Gunkel W: Erstversorgung bei Thoraxtrauma. Anaesthesist 55: 1172-1188 (2006)

98. Knöferl MW, Liener UC, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, Gebhard F: Blunt chest trauma induces delayed splenic immunosuppression. Shock 22: 51-56 (2004)

99. Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, Gebhard F: Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. Shock 19: 519-525 (2003)

100. Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T: A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. J Atheroscler Thromb 11: 88-97 (2004)

101. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S: Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. Nat Med 3: 409-413 (1997)

102. Koseki T, Inohara N, Chen S, Nunez G: ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 5156-5160 (1998)

103. Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R: Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. J Biol Chem 276: 26605-26613 (2001)

104. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y: Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. J Immunol 171: 4672-4679 (2003)

105. Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y: Production of proinflammatory cytokines by resident tissue macrophages after phagocytosis of apoptotic cells. Cell Immunol 211: 1-7 (2001)

106. Kwon OJ, Jose PJ, Robbins RA, Schall TJ, Williams TJ, Barnes PJ: Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 12: 488-496 (1995)

107. Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, Lira SA, Weissman IL, Weber C, Jung S: CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. Blood 113: 963-972 (2009)

108. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S: Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. Cell 113: 717-730 (2003)

109. Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schutze S, Peter ME, Chan AC: The role of receptor internalization in CD95 signaling. EMBO J 25: 1009-1023 (2006)

110. Leonard EJ, Skeel A, Yoshimura T, Rankin J: Secretion of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by human mononuclear phagocytes. Adv Exp Med Biol 351: 55-64 (1993)

111. Liener UC, Knöferl MW, Sträter J, Barth TF, Pauser EM, Nüssler AK, Kinzl L, Brückner UB, Gebhard F: Induction of apoptosis following blunt chest trauma. Shock 20: 511-516 (2003)

112. Liener UC, Perl M, Huber-Lang MS, Seitz DH, Brückner UB, Gebhard F, Knöferl MW: Is the function of alveolar macrophages altered following blunt chest trauma? Langenbecks Arch Surg 396: 251-259 (2010)

113. Lin PM, Wright JR: Surfactant protein A binds to IgG and enhances phagocytosis of IgG-opsonized erythrocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291: L1199-L1206 (2006)

114. Liu CY, Liu YH, Lin SM, Yu CT, Wang CH, Lin HC, Lin CH, Kuo HP: Apoptotic neutrophils undergoing secondary necrosis induce human lung epithelial cell detachment. J Biomed Sci 10: 746-756 (2003)

115. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B: Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. FASEB J 8: 1055-1060 (1994)

116. Lomas-Neira J, Chung CS, Perl M, Gregory S, Biffl W, Ayala A: Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L51-L58 (2006)

117. Lowicka E, Beltowski J: Hydrogen sulfide (H2S) - the third gas of interest for pharmacologists. Pharmacol Rep 59: 4-24 (2007)

118. Lucas AD, Chadwick N, Warren BF, Jewell DP, Gordon S, Powrie F, Greaves DR: The Transmembrane Form of the CX3CL1 Chemokine Fractalkine Is Expressed Predominantly by Epithelial Cells in Vivo. The American Journal of Pathology 158: 855-866 (2001)

119. Ma X, Xu D, Ai Y, Ming G, Zhao S: Fas inhibition attenuates lipopolysaccharide-induced apoptosis and cytokine release of rat type II alveolar epithelial cells. Mol Biol Rep 37: 3051-3056 (2010)

120. Matsumoto N, Imamura R, Suda T: Caspase-8- and JNK-dependent AP-1 activation is required for Fas ligand-induced IL-8 production. FEBS J 274: 2376-2384 (2007)

121. Matsuno H, Yudoh K, Watanabe Y, Nakazawa F, Aono H, Kimura T: Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. J Rheumatol 28: 22-28 (2001)

122. Matute-Bello G, Liles WC, Frevert CW, Dhanireddy S, Ballman K, Wong V, Green RR, Song HY, Witcher DR, Jakubowski JA, Martin TR: Blockade of the Fas/FasL system improves pneumococcal clearance from the lungs without preventing dissemination of bacteria to the spleen. J Infect Dis 191: 596-606 (2005)

123. 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 163: 2217-2225 (1999)

124. Mevorach D: Opsonization of apoptotic cells. Implications for uptake and autoimmunity. Ann N Y Acad Sci 926: 226-235 (2000)

125. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB: Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. J Exp Med 188: 2313-2320 (1998)

126. Miksa M, Amin D, Wu R, Ravikumar TS, Wang P: Fractalkine-induced MFG-E8 leads to enhanced apoptotic cell clearance by macrophages. Mol Med 13: 553-560 (2007)

127. 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 31: 386-390 (2008)

128. Moffatt OD, Devitt A, Bell ED, Simmons DL, Gregory CD: Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes. J Immunol 162: 6800-6810 (1999)

129. Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH: H2S signals through protein S-sulfhydration. Sci Signal 2: ra72- (2009)

130. Nadesalingam J, Reid KB, Palaniyar N: Collectin surfactant protein D binds antibodies and interlinks innate and adaptive immune systems. FEBS Lett 579: 4449-4453 (2005)

131. Nagata S: Fas ligand-induced apoptosis. Annu Rev Genet 33: 29-55 (1999)

132. Nakamura M, Matute-Bello G, Liles WC, Hayashi S, Kajikawa O, Lin SM, Frevert CW, Martin TR: Differential response of human lung epithelial cells to fas-induced apoptosis. Am J Pathol 164: 1949-1958 (2004)

133. Nishizuka Y: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. Nature 308: 693-698 (1984)

134. Nutt LK, Chandra J, Pataer A, Fang B, Roth JA, Swisher SG, O'Neil RG, McConkey DJ: Bax-mediated Ca2+ mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. J Biol Chem 277: 20301-20308 (2002)

135. O'Croinin DF, Nichol AD, Hopkins N, Boylan J, O'Brien S, O'Connor C, Laffey JG, McLoughlin P: Sustained hypercapnic acidosis during pulmonary infection increases bacterial load and worsens lung injury. Crit Care Med 36: 2128-2135 (2008)

136. O'Reilly PJ, Hickman-Davis JM, Davis IC, Matalon S: Hyperoxia impairs antibacterial function of macrophages through effects on actin. Am J Respir Cell Mol Biol 28: 443-450 (2003)

137. 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 10: 7-12 (1998)

138. Obertacke U, Redl H, Schlag G, Schmit-Neuerburg KP: Lokale und systemische Reaktionen nach Lungenkontsion. Hefte zu Der Unfallchirurg 240: (1994)

139. Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ, Chung HT: Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Free Radic Biol Med 41: 106-119 (2006)

140. Ohno S, Nishizuka Y: Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. J Biochem 132: 509-511 (2002)

141. Otto WR: Lung epithelial stem cells. J Pathol 197: 527-535 (2002)

142. 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 34: 540-547 (1993)

143. Park DR, Thomsen AR, Frevert CW, Pham U, Skerrett SJ, Kiener PA, Liles WC: Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. J Immunol 170: 6209-6216 (2003)

144. Park SY, Jung MY, Kim HJ, Lee SJ, Kim SY, Lee BH, Kwon TH, Park RW, Kim IS: Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. Cell Death Differ 15: 192-201 (2008)

145. Patel PC, Harrison RE: Membrane ruffles capture C3bi-opsonized particles in activated macrophages. Mol Biol Cell 19: 4628-4639 (2008)

146. Perl M, Chung CS, Ayala A: Apoptosis. Crit Care Med 33: S526-S529 (2005)

147. Perl M, Gebhard F, Braumüller S, Tauchmann B, Brückner UB, Kinzl L, Knöferl MW: The pulmonary and hepatic immune microenvironment and its contribution to the early systemic inflammation following blunt chest trauma. Crit Care Med 34: 1152-1159 (2006)

148. Perl M, Kieninger M, Huber-Lang FS, Gross HJ, Bachem MG, Braumuller S, Gebhard F, Ayala A, Knoferl MW: Divergent Effects of Activated Neutrophils on Inflammation, Kupffer Cell/ Splenocyte Activation and Lung Injury Following Blunt Chest Trauma. Shock (2011)

149. Perl M, Kieninger M, Huber-Lang MS, Gross HJ, Bachem MG, Braumuller S, Gebhard F, Ayala A, Knoferl MW: Divergent effects of activated neutrophils on inflammation, kupffer cell/splenocyte activation, and lung injury following blunt chest trauma. Shock 37: 210-218 (2012)

150. Perros F, Dorfmüller P, Souza R, Durand-Gasselin I, Godot V, Capel F, Adnot S, Eddahibi S, Mazmanian M, Fadel E, Herve P, Simonneau G, Emilie D, Humbert M: Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. European Respiratory Journal 29: 937-943 (2007)

151. Peter C, Waibel M, Radu CG, Yang LV, Witte ON, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S, Lauber K: Migration to apoptotic "find-me" signals is mediated via the phagocyte receptor G2A. J Biol Chem 283: 5296-5305 (2008)

152. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H, Wallach D, Wiltrout RH, Zornig M, Lynch DH: The CD95 receptor: apoptosis revisited. Cell 129: 447-450 (2007)

153. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT: Anti-apoptosis and cell survival: a review. Biochim Biophys Acta 1813: 238-259 (2011)

154. Raghavendran K, Davidson BA, Knight PR, Wang Z, Helinski J, Chess PR, Notter RH: Surfactant dysfunction in lung contusion with and without superimposed gastric aspiration in a rat model. Shock 30: 508-517 (2008)

155. Ramos CD, Canetti C, Souto JT, Silva JS, Hogaboam CM, Ferreira SH, Cunha FQ: MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. J Leukoc Biol 78: 167-177 (2005)

156. Ranjan K, Surolia A, Pathak C: Apoptotic potential of Fas-associated death domain on regulation of cell death regulatory protein cFLIP and death receptor mediated apoptosis in HEK 293T cells. J Cell Commun Signal 155-168 (2012)

157. Ravetch JV, Bolland S: IgG Fc receptors. Annu Rev Immunol 19: 275-290 (2001)

158. Ravetch JV, Kinet JP: Fc receptors. Annu Rev Immunol 9: 457-492 (1991)

159. Reidy MF, Wright JR: Surfactant protein A enhances apoptotic cell uptake and TGF-beta1 release by inflammatory alveolar macrophages. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285: L854-L861 (2003)

160. Ren Y, Savill J: Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. J Immunol 154: 2366-2374 (1995)

161. 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 104: 791-800 (2001)

162. Rosen H, Law SK: The leukocyte cell surface receptor(s) for the iC3b product of complement. Curr Top Microbiol Immunol 153: 99-122 (1990)

163. Rosenbaum S, Kreft S, Etich J, Frie C, Stermann J, Grskovic I, Frey B, Mielenz D, Poschl E, Gaipl U, Paulsson M, Brachvogel B: Identification of novel binding partners (annexins) for the cell death signal phosphatidylserine and definition of their recognition motif. J Biol Chem 286: 5708-5716 (2011)

164. Roth MB, Nystul TG: Überleben im Kälteschlaf. Spektrum der Wissenschaft (2005)

165. Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A: CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. J Biol Chem 275: 29338-29347 (2000)

166. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C: Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. J Clin Invest 90: 1513-1522 (1992)

167. Schagat TL, Wofford JA, Wright JR: Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. J Immunol 166: 2727-2733 (2001)

168. Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV: Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. J Exp Med 177: 1821-1826 (1993)

169. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV: Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. Nature 347: 669-671 (1990)

170. Schlag G: Morphology of the lung as a consequence of direct and indirect trauma. 161-175 (1993)

171. Schlag G, Redl H, Buchinger W, Dinges HP: Pathophysiologie der Lungenkontusion. Hefte zur Unfallheilkunde 233: 13-17 (1992)

172. Schulte M, Reiss K, Lettau M, Maretzky T, Ludwig A, Hartmann D, de SB, Janssen O, Saftig P: ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. Cell Death Differ 14: 1040-1049 (2007)

173. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ: BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis. Science 300: 135-139 (2003)

174. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS, Matsushima GK: Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. Nature 411: 207-211 (2001)

175. Sehgal PB: Interleukin-6 in vivo. Folia Histochem Cytobiol 30: 195-196 (1992)

176. Seitz DH, Fröba JS, Niesler U, Palmer A, Veltkamp HA, Braumüller ST, Wagner F, Wagner K, Bäder S, Wachter U, Calzia E, Radermacher P, Huber-Lang MS, Zhou S, Gebhard F, Knöferl MW: Inhaled hydrogen sulfide induces suspended animation, but does not alter the inflammatory response after blunt chest trauma. Shock 37: 197-204 (2012)

177. Seitz DH, Niesler U, Palmer A, Sulger M, Braumüller ST, Perl M, Gebhard F, Knöferl MW: Blunt chest trauma induces mediator-dependent monocyte migration to the lung. Crit Care Med 38: 1852-1859 (2010)

178. 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 30: 537-544 (2008)

179. Shalaby MR, Palladino MA, Jr., Hirabayashi SE, Eessalu TE, Lewis GD, Shepard HM, Aggarwal BB: Receptor binding and activation of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor-alpha. J Leukoc Biol 41: 196-204 (1987)

180. Shanley TP, Schmal H, Friedl HP, Jones ML, Ward PA: Regulatory effects of intrinsic IL-10 in IgG immune complex-induced lung injury. J Immunol 154: 3454-3460 (1995)

181. Shanley TP, Schmal H, Friedl HP, Jones ML, Ward PA: Role of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) in acute lung injury in rats. J Immunol 154: 4793-4802 (1995)

182. Shanley TP, Schmal H, Warner RL, Schmid E, Friedl HP, Ward PA: Requirement for C-X-C chemokines (macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury. J Immunol 158: 3439-3448 (1997)

183. Shaw DR, Griffin FM, Jr.: Phagocytosis requires repeated triggering of macrophage phagocytic receptors during particle ingestion. Nature 289: 409-411 (1981)

184. Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, Lee KY, Bussey C, Steckel M, Tanaka N, Yamada G, Akira S, Matsumoto K, Ghosh S: TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. Genes Dev 19: 2668-2681 (2005)

185. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y: Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. Mol Cell 11: 519-527 (2003)

186. Simbirtsev A, Variouchina E, Konusova V, Kotov A, Ketlinsky S, Salamatov A, Bisenkov L: Local administration of interleukin-1beta for the treatment of lung abscesses induces neutrophil activation and changes in proinflammation cytokine production. Eur Cytokine Netw 12: 420-429 (2001)

187. Somersan S, Bhardwaj N: Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. J Cell Biol 155: 501-504 (2001)

188. Speyer CL, Gao H, Rancilio NJ, Neff TA, Huffnagle GB, Sarma JV, Ward PA: Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. Am J Pathol 165: 2187-2196 (2004)

189. Szabo C: Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov 6: 917-935 (2007)

190. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T: Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. Cell 58: 573-581 (1989)

191. Takabatake N, Nakamura H, Inoue S, Terashita K, Yuki H, Kato S, Yasumura S, Tomoike H: Circulating levels of soluble Fas ligand and soluble Fas in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Respir Med 94: 1215-1220 (2000)

192. Takizawa F, Tsuji S, Nagasawa S: Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. FEBS Lett 397: 269-272 (1996)

193. Tassiopoulos AK, Hakim TS, Finck CM, Pedoto A, Hodell MG, Landas SK, McGraw DJ: Neutrophil sequestration in the lung following acute aortic occlusion starts during ischaemia and can be attenuated by tumour necrosis factor and nitric oxide blockade. Eur J Vasc Endovasc Surg 16: 36-42 (1998)

194. Tenner AJ, Robinson SL, Borchelt J, Wright JR: Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. J Biol Chem 264: 13923-13928 (1989)

195. Todt JC, Hu B, Punturieri A, Sonstein J, Polak T, Curtis JL: Activation of protein kinase C beta II by the stereo-specific phosphatidylserine receptor is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes by resident murine tissue macrophages. J Biol Chem 277: 35906-35914 (2002)

196. Torr EE, Gardner DH, Thomas L, Goodall DM, Bielemeier A, Willetts R, Griffiths HR, Marshall LJ, Devitt A: Apoptotic cell-derived ICAM-3 promotes both macrophage chemoattraction to and tethering of apoptotic cells. Cell Death Differ 19: 671-679 (2012)

197. Truman LA, Ford CA, Pasikowska M, Pound JD, Wilkinson SJ, Dumitriu IE, Melville L, Melrose LA, Ogden CA, Nibbs R, Graham G, Combadiere C, Gregory CD: CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. Blood 112: 5026-5036 (2008)

198. Trupka A, Nast-Kolb D, Schweiberer L: Das Thoraxtrauma. Unfallchirurg 101: 244-258 (1998)

199. Tsou CL, Haskell CA, Charo IF: Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. J Biol Chem 276: 44622-44626 (2001)

200. Uehara H, Shacter E: Auto-oxidation and oligomerization of protein S on the apoptotic cell surface is required for Mer tyrosine kinase-mediated phagocytosis of apoptotic cells. J Immunol 180: 2522-2530 (2008)

201. Uhal BD: Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. Am J Physiol 272: L1031-L1045 (1997)

202. Umemura M, Kawabe T, Shudo K, Kidoya H, Fukui M, Asano M, Iwakura Y, Matsuzaki G, Imamura R, Suda T: Involvement of IL-17 in Fas ligand-induced inflammation. Int Immunol 16: 1099-1108 (2004)

203. van Golde LM, Batenburg JJ, Robertson B: The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. Physiol Rev 68: 374-455 (1988)

204. van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde LM: Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol 2: 91-98 (1990)

205. Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, Walport MJ, Fisher JH, Henson PM, Greene KE: Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. J Immunol 169: 3978-3986 (2002)

206. VanOtteren GM, Strieter RM, Kunkel SL, Paine R, III, Greenberger MJ, Danforth JM, Burdick MD, Standiford TJ: Compartmentalized expression of RANTES in a murine model of endotoxemia. J Immunol 154: 1900-1908 (1995)

207. Vargo-Gogola T, Crawford HC, Fingleton B, Matrisian LM: Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand. Arch Biochem Biophys 408: 155-161 (2002)

208. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I: Immunosuppressive effects of apoptotic cells. Nature 390: 350-351 (1997)

209. Volpato GP, Searles R, Yu B, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Ichinose F, Zapol WM: Inhaled hydrogen sulfide: a rapidly reversible inhibitor of cardiac and metabolic function in the mouse. Anesthesiology 108: 659-668 (2008)

210. Vu CC, Bortner CD, Cidlowski JA: Differential involvement of initiator caspases in apoptotic volume decrease and potassium efflux during Fas- and UV-induced cell death. J Biol Chem 276: 37602-37611 (2001)

211. Wang N, Gates KL, Trejo H, Favoreto S Jr, Schleimer RP, Sznajder JI, Beitel GJ, Sporn PH: Elevated CO2 selectively inhibits interleukin-6 and tumor necrosis factor expression and decreases phagocytosis in the macrophage. FASEB J (2010)

212. Wang R: Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J 16: 1792-1798 (2002)

213. Watanabe K, Koizumi F, Kurashige Y, Tsurufuji S, Nakagawa H: Rat CINC, a member of the interleukin-8 family, is a neutrophil-specific chemoattractant in vivo. Exp Mol Pathol 55: 30-37 (1991)

214. Watanabe K, Konishi K, Fujioka M, Kinoshita S, Nakagawa H: The neutrophil chemoattractant produced by the rat kidney epithelioid cell line NRK-52E is a protein related to the KC/gro protein. J Biol Chem 264: 19559-19563 (1989)

215. Windsor AC, Walsh CJ, Mullen PG, Cook DJ, Fisher BJ, Blocher CR, Leeper-Woodford SK, Sugerman HJ, Fowler AA, III: Tumor necrosis factor-alpha blockade prevents neutrophil CD18 receptor upregulation and attenuates acute lung injury in porcine sepsis without inhibition of neutrophil oxygen radical generation. J Clin Invest 91: 1459-1468 (1993)

216. Wofford JA, Wright JR: Surfactant protein A regulates IgG-mediated phagocytosis in inflammatory neutrophils. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293: L1437-L1443 (2007)

217. Wolters PJ, Wray C, Sutherland RE, Kim SS, Koff J, Mao Y, Frank JA: Neutrophil-Derived IL-6 Limits Alveolar Barrier Disruption in Experimental Ventilator-Induced Lung Injury. J Immunol 182: 8056-8062 (2009)

218. Wright SD, Silverstein SC: Tumor-promoting phorbol esters stimulate C3b and C3b' receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. J Exp Med 156: 1149-1164 (1982)

219. Wyble CW, Desai TR, Clark ET, Hynes KL, Gewertz BL: Physiologic concentrations of TNFalpha and IL-1beta released from reperfused human intestine upregulate E-selectin and ICAM-1. J Surg Res 63: 333-338 (1996)

220. Yamasawa H, Ishii Y, Kitamura S: Cytokine-induced neutrophil chemoattractant in a rat model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. Inflammation 23: 263-274 (1999)

221. Yan SF, Tritto I, Pinsky D, Liao H, Huang J, Fuller G, Brett J, May L, Stern D: Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. J Biol Chem 270: 11463-11471 (1995)

222. Zagorski J, Delarco JE: Rat CINC (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) is the homolog of the human GRO proteins but is encoded by a single gene. Biochem Biophys Res Commun 190: 104-110 (1993)

223. Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL: Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. FASEB J 20: 2118-2120 (2006)

224. Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A: Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. Nature 392: 296-300 (1998)

225. Zhang LJ, Tao BB, Wang MJ, Jin HM, Zhu YC: PI3K p110alpha isoform-dependent Rho GTPase Rac1 activation mediates H2S-promoted endothelial cell migration via actin cytoskeleton reorganization. PLoS One 7: e44590- (2012)

226. Zhang XW, Liu Q, Wang Y, Thorlacius H: CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. Br J Pharmacol 133: 413-421 (2001)

Danksagung

Mein Dank gilt besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Markus Knöferl, der es mir ermöglicht hat in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit zu erstellen. Die interessante Aufgabenstellung und seine stete Unterstützung stellen einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Promotion dar.

Herrn Prof. Dr. Florian Gebhard, ärztlicher Direktor der Klinik für Unfallchirurgie, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Universität Ulm danke ich für die volle Unterstützung dieser Arbeit und die Möglichkeit, im Traumalabor meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

An dieser Stelle möchte ich auch besonders allen Mitarbeitern des Traumalabors der Klinik für Unfallchirurgie, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Universität Ulm für die schöne Zusammenarbeit danken. Die Tierstudien wurden immer gemeinsam im Team mit Frau Dr. Ulrike Niesler, Frau Janine Fröba, Frau Anne Rittlinger und Frau Sonja Braumüller durchgeführt. Vielen Dank für das Durchhaltevermögen an so manchem langen Tag.

Auch bei Stephanie Mangold und Alexander Veltkamp möchte ich mich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Doktorarbeiten bedanken.

Herrn PD Dr. Daniel Seitz, Frau Dr. Niesler und Frau Anke Schultze möchte ich insbesondere für das Korrekturlesen danken.

Ein ganz herzlicher Dank gilt auch meiner Familie.

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt