Klinik für Unfallchirurgie, Hand-,

Plastische und Wiederherstellungschirurgie,

Zentrum für Chirurgie,

Universität Ulm

Ärztlicher Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Florian Gebhard

Die Rolle des necroptotischen Zelltodes und der Receptor Interacting Protein Kinase 1 (RIPK1) in der septischen akuten Lungenschädigung nach Trauma

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Sascha Weber

geboren in Völklingen

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Mario Perl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Anita Ignatius

Tag der Promotion: 18.12.2015

Die Widmung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis
1. Einleitung ..... - 1 -
1.1 Definition und Epidemiologie von ALI/ARDS, Thoraxtrauma und Sepsis ..... - 1 -
1.2 Das Double-Hit Modell von Thoraxtrauma und Sepsis ..... - 2 -
1.3 Programmierter Zelltod: Apoptose und Necroptose ..... - 3 -
1.4 Pathomechanismus von ALI und Sepsis ..... - 5 -
1.5 Offene Fragen und Zielsetzung der Studie ..... - 8 -
2. Material und Methoden ..... - 9 -
2.1 Materialien ..... - 9 -
2.1.1 Reagenzien ..... - 9 -
2.1.2 siRNA und Primer ..... - 9 -
2.1.3 Zelllinien und Kulturmedien ..... - 10 -
2.2 Vorarbeiten ..... - 10 -
2.2.1 Transfektionsoptimierung ..... - 10 -
2.2.2 RIPK1 siRNA Transfektion von MHS und MLE12 Zellen ..... - 11 -
2.2.3 Western Blot und PCR-Kontrolle der RIPK1 siRNA Transfektion der Zellen - 11 -
2.2.4 Fluoreszenzfärbung transfizierter Zellen ..... - 15 -
2.3 Double-Hit Modell von Thoraxtrauma und Sepsis ..... - 15 -
2.3.1 Applikation der Traumata und Instillation der siRNA ..... - 15 -
2.3.2 Gewinnung des Probenmaterials ..... - 18 -
2.3.3 PCR aus dem Lungengewebe ..... - 19 -
2.3.4 Western Blot aus Lungengewebe ..... - 19 -
2.3.5 Zytokin ELISA der Lungenhomogenate, Plasma und BAL ..... - 20 -
2.3.6 TUNEL Färbung von Lungengewebsschnitten ..... - 21 -
2.3.7 Messung der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe ..... - 22 -
2.3.8 BAL Proteingehalt, Zellzählung und –differenzierung ..... - 24 -
2.3.9 Immunhistochemische Färbung von Lungengewebsschnitten ..... - 24 -
2.3.10 Mikroskopische Beurteilung ..... - 25 -
2.4 Nachbearbeitung im *in vitro* Versuch ..... - 26 -
2.4.1 Koinkubation TNF-α stimulierter Zellen mit zVAD-fmk und Necrostatin-1 .... - 26 -
2.4.2 Jo-2 und TNF-α Stimulation von RIPK1-gesilencten Zellen ..... - 27 -
2.5 Statistik ..... - 29 -

3. Ergebnisse ..... - 30 -
3.1 Etablierung des Knockdowns von RIPK1 an MLE12 Zellen ..... - 30 -
3.2 Evaluation des Knockdowns von RIPK1 im Double-Hit Modell von Thoraxtrauma und Sepsis ..... - 33 -
3.2.1 RIPK1 mRNA Quantifizierung mittels RT-qPCR ..... - 33 -
3.2.2 Western Blotting von RIPK1 im Lungenhomogenat ..... - 35 -
3.2.3 Immunhistochemische Färbung von RIPK1 in Lungengewebe ..... - 36 -
3.3 Gewichte der Tiere ..... - 37 -
3.4 ELISA ..... - 38 -
3.4.1 Zytokine / Chemokine im Lungenhomogenat ..... - 38 -
3.4.2 Zytokine / Chemokine im Plasma ..... - 40 -
3.4.3 Zytokine / Chemokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit ..... - 42 -
3.5 Myeloperoxidaseaktivität ..... - 45 -
3.6 Zellzählung und -differenzierung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit ..... - 46 -
3.7 Western Blotting von Caspase-3 im Lungenhomogenat ..... - 47 -
3.8 TUNEL-Färbung von Lungengewebsschnitten ..... - 48 -
3.9 Bestimmung der alveolokapillären Leckage und der Lungenschädigung ..... - 50 -
3.10 Mechanistische Studie im Zellmodell ..... - 52 -
3.10.1 Koinkubation TNF-α stimulierter Zellen mit zVAD-fmk und Necrostatin-1 .. - 52 -
3.10.2 Jo-2 und TNF-α Stimulation von RIPK1 siRNA behandelten Zellen ..... - 54 -
4. Diskussion ..... - 57 -
4.1 RIPK1 Knockdown auf zellulärer Ebene und im Tiermodell ..... - 57 -
4.2 Auswirkungen der RIPK1 siRNA Applikation auf die Inflammation bei der traumainduzierten septischen akuten Lungenschädigung…. ..... - 58 -
4.3 Auswirkungen der RIPK1 siRNA Applikation auf die Apoptose und Barrierestörung bei der traumainduzierten septischen akuten Lungenschädigung ..... - 67 -
4.4 Einfluss von Necrostatin-1 und RIPK1 Silencing auf die Inflammation und Apoptose *in vitro* ..... - 69 -
4.5 Einschränkungen der Studie ..... - 72 -
4.6 Schlussfolgerungen ..... - 74 -
5. Zusammenfassung ..... - 76 -
6. Literaturverzeichnis ..... - 78 -
Danksagung
Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

(c)DNA	(copy) Deoxyribonucleic Acid (engl.)
7-AAD	7-Aminoactinomycin
Abk.	Abkürzung(en)
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
ALI	Acute Lung Injury (engl.)
ANOVA	Analysis of Variance (engl.)
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome (engl.)
AT-II	Angiotensin-II
BAL(F)	bronchoalveoläre Lavage(flüssigkeit)
BCA	Bicinchoninic Acid (engl.)
BCL-2	B-cell lymphoma 2 (engl.)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (engl.)
BSA	bovines Serumalbumin
CD95	Cluster of Differentiation 95 (engl.) = Fas-Rezeptor
cIAPs	cellular Inhibitors of Apoptosis (engl.)
CLP	Cecal Ligation and Puncture (engl.)
CO_2	Kohlenstoffdioxid
C_T	Threshold Cycle (engl.)
DAMPs	Danger/Damage-Associated Molecular Patterns (engl.)
DED	Death Effector Domain (engl.)
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DH	Double-Hit (engl.)
DISC	Death-Inducing Signaling Complex (engl.)
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium (engl.)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline (engl.)

ECL	Enhanced Chemiluminescence (engl.)
ERK	Extracellular-Signal Regulated Kinase (engl.)
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting (engl.)
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain (engl.)
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetal Calf Serum (engl.)
FLIP	FLICE-like Inhibitory Proteins (engl.)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (engl.)
GFP	Green Fluorescent Protein (engl.)
Gnb2L	Guanine Nucleotide Binding Protein 2L (engl.)
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H_2SO_4	Schwefelsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horse-Radish Peroxidase (engl.)
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1 (engl.)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 Receptor Antagonist (engl.)
JNK	c-Jun N-terminal kinase (engl.)
KC	Keratinocyte-derived Chemokine (engl.)
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
L929	murine Fibroblastenzelllinie (aus dem Stamm „L“ einer männlichen C3H/An Maus)
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase (engl.)

MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1 (engl.)
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts (engl.)
MHS	murine Alveolarmakrophagenzelllinie (benannt nach I. Mbawuike und H. Herscowitz)
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein-2 (engl.)
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (engl.)
miRNA	micro Ribonucleic Acid (engl.)
MLE12	Murine Lung Epithelial Cells 12 (engl.)
MPO	Myeloperoxidase
NEMO	Nuclear Factor kappa-B essential modulator (engl.)
NFκB	Nuclear Factor kappa-B (engl.)
PBS(T)	Phosphate Buffered Saline (+Tween 20) (engl.)
PMN	Polymorphonuclear Leucocytes (engl.)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	Pathogen Recognition Receptors (engl.)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REST	Relative Expression Software Tool (engl.)
RHIM	Receptor Interacting Protein Homotypic Interaction Motif (engl.)
RIPA	Radio-Immunprecipitation Assay (engl.)
RIPK1	Receptor Interacting Protein Kinase 1 (Synonym: RIP1) (engl.)
RIPK3	Receptor Interacting Protein Kinase 3 (Synonym: RIP3) (engl.)
RISC	Ribonucleic Acid-Induced Silencing Complex (engl.)
Rpm	Revolutions Per Minute (engl.)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium (engl.)
RT	Raumtemperatur

RTq-PCR	Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction (engl.)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (engl.)
sIL-6R	soluble Interleukin-6 Receptor (engl.)
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid (engl.)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome (engl.)
sTNFR-I/II	soluble Tumor Necrosis Factor Receptor-I/II (engl.)
TAB2/3	TAK-1-Binding Protein 2/3 (engl.)
TAK1	Transforming Growth Factor ß-associated Kinase 1 (engl.)
TBS(T)	Tris-Buffered Saline (+Tween 20) (engl.)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-Like Receptor (engl.)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha (engl.)
TRADD	TNFR1-Associated Death Domain Protein (engl.)
TRAF	TNF Receptor-Associated Factor (engl.)
TRAIL(R)	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (Receptor) (engl.)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (engl.)
TxT	Thoraxtrauma
zVAD-fmk	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon (Pancaspaseninhibitor)

1. Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie von ALI/ARDS, Thoraxtrauma und Sepsis

Die akute Lungenschädigung (acute lung injury, ALI) und das akute respiratorische Distresssyndrom (ARDS) sind klinisch hochrelevante Krankheitsbilder mit einer Inzidenz von 79 für ALI und 59 für ARDS pro 100000 Einwohner und Jahr sowie einer Letalität von etwa 40 % [97]. Überlebende kämpfen noch Monate nach der Erkrankung mit den Langzeitfolgen wie reduzierter körperlicher Belastbarkeit und reduzierter pulmonaler Diffusionskapazität [29]. Zur Diagnosestellung werden gefordert: röntgenologische diffuse bilaterale pulmonale Infiltrate, eine Hypoxämie sowie der Ausschluss einer pulmonalen Hypertonie oder linksatrialer Ursachen als Grund der Lungeninfiltrate. Der Grad der Hypoxämie differenziert hierbei zwischen ALI und ARDS [5]. Trotz intensiver Bemühungen steht eine kausale Therapie bis zum heutigen Zeitpunkt nicht zur Verfügung [79, 126].

Es werden direkte (pulmonale) sowie indirekte (extrapulmonale) Auslöser der akuten Lungenschädigung unterschieden. Indirekte Auslöser der ALI können beispielsweise eine Sepsis oder diverse Traumata sein, während Lungenentzündung, Aspiration, Rauchgasinhalation, Lungenkontusion, Fett- oder Fruchtwasserembolie direkte Auslöser darstellen können [88, 126]. In 55 % der Fälle von ALI liegen direkte, in 20 % handelt es sich um rein indirekte Ursachen der akuten Lungenschädigung. Mischformen sind in 21 % der Fälle beteiligt [6].

Obwohl nur mit knapp 2,4 % an der Zahl der Gesamttodesfälle 2012 beteiligt, stellt der Unfall jährlich bei über 20000 Menschen die Todesursache dar [106]. Ca. 50 – 60 % der polytraumatisierten Patienten erleiden hierbei ein stumpfes Thoraxtrauma, wobei die Anwesenheit eines begleitenden Thoraxtraumas die Letalität beim Polytrauma von 27 auf 56 % erhöht [23, 35].

Sepsis stellt auch heute noch eine der führenden Todesursachen intensivmedizinisch versorgter Patienten dar [59]. Dabei bezeichnet der Terminus Sepsis eine von einer Infektion begleitete systemische Entzündungsreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) [8, 17]. Obwohl durch

intensivmedizinische Bemühungen die Gesamtletalität im Zeitraum 1979 bis 2000 von 27,8 % auf 17,9 % gesenkt werden konnte, stieg im gleichen Zeitraum die Inzidenz von 83 auf 240 Fälle pro 100000 Einwohner und Jahr sowie die Gesamtzahl der sepsisbezogenen Todesfälle [59].

1.2 Das Double-Hit Modell von Thoraxtrauma und Sepsis

Die Komplexität der Interaktionen der verschiedenen Gewebe und Zellpopulationen während Thoraxtrauma und Sepsis kann bisher nur unzureichend in Zell- und Tiermodellen wiedergegeben werden [91]. Viele Modelle in der Literatur beschränken sich auf die Untersuchung von entweder direkten oder indirekten Modellen von ALI, was die Dynamik der klinisch relevanten traumainduzierten septischen Lungenschädigung nur unzureichend beschreibt. Die Kombination klinisch relevanter Modelle („Double-Hit“, DH) kann dazu beitragen, die Dynamik der Lungenschädigung im menschlichen Patienten besser zu verstehen [62, 91]. Aus diesem Grunde basiert die vorliegende Studie auf dem Modell der traumainduzierten septischen Lungenschädigung [85] induziert durch ein Thoraxtrauma und nachfolgende Sepsis.

Die Applikation von small interfering RNA (siRNA) ist ein vielversprechender Ansatz sowohl in der experimentellen Forschung als auch möglichen Therapie [75, 112]. Hierbei wird ein 21-23 Basenpaare langes doppelsträngiges RNA-Segment über dessen antisense Strang in den sog. RISC (engl. RNA-induced silencing complex) inkorporiert und die hierzu komplementäre zelluläre mRNA spezifisch degradiert [112]. Die von Perl et. al. etablierte Methode der intratrachealen Applikation nakter vectorfreier siRNA erwies sich als geeignetes Mittel, um lokale Zielstrukturen in der Lunge zu erreichen. Bei dieser Methode werden relativ spezifisch Zytokeratin-18-positive Lungenepithelzellen erfasst, ohne dass RNA-Interferenzen in ortsständigen Makrophagen oder systemische Wirkungen erkennbar wären [79]. Auf diese Weise ist es möglich, epitheliale intrazelluläre Signalwege zu entschlüsseln und gleichzeitig deren Potenzial als therapeutisches Ziel einzuschätzen.

1.3 Programmierter Zelltod: Apoptose und Necroptose

Das klassische Verständnis des Begriffes „programmierter Zelltod“ wird mit dem Konzept der Apoptose in Verbindung gebracht. Apoptose bezeichnet die durch externe oder interne Stimuli hervorgerufene kontrollierte Desintegration der zellulären Struktur. Dabei kommt es zur Aktivierung einer Kaskade von Initiator- (Caspase-8/-9/-10/-2) und Effektorcaspasen (Caspase-3/-6/-7), die letztlich in der Vakuolisierung des Zytoplasmas, Schrumpfung der Zelle, Abbau des zellulären Proteingerüstes durch aspartat-spezifische Proteasen sowie Chromatin-kondensation und Fragmentation der nukleären Desoxyribonucleinsäure (DNS) resultiert [43].

Die wichtigste Komponente der extrinsischen Apoptosekaskade bildet die TNF-Rezeptor-Familie (TNFR1, Fas, TRAIL) [32, 41, 60]. Die ligandengetriggerte Aktivierung des Fas-Rezeptors bewirkt nach Rezeptortrimerisierung über homotypische Interaktionen eine Rekrutierung von Adaptermolekülen der Death Domain(DD)-Superfamilie, bzw. Death Effector Domain (DED)-Subfamilie. Im speziellen sind dies FADD und Caspase-8, die dann den sogenannten Death-Inducing Signaling Complex (DISC) bilden, der als molekulare Plattform für die Aktivierung der Caspase-8 und der Effektorcaspasen dient [76]. TNFR1 hingegen rekrutiert über seine Todesdomänen die multifunktionalen Adaptermoleküle TRADD (engl. TNFR1-associated death domain protein), TRAF2 und 5 (engl. TNF receptor-associated factor) sowie RIPK1 (receptor interacting protein kinase 1) zum sog. Komplex I [76]. Nach Rezeptordissoziation und Rekrutierung von FADD und Caspase-8 zum jetzt zytoplasmatischen Komplex II erfolgt die weitere Aktivierung der Effektorcaspasen analog zu Fas [71]. FLIP (FLICE-like inhibitory proteins) Proteine wirken hierbei über ihre DED regulatorisch auf die Caspase-8, sowohl auf Ebene des Komplex II als auch des DISC [113].

Die heutige Vorstellung von programmiertem Zelltod beinhaltet die Entitäten Apoptose, autophagischer Zelltod und Necroptose [43]. Eine zelluläre Nekrose resultiert hierbei in der Schwellung der Zelle (Onkose) und deren Organellen, Aufhellung des Zytoplasmas und Verlust der zellulären Membranintegrität. Es ist in diesem Zuge nicht möglich, morphologisch zwischen kontrollierter Nekrose, sekundärer Nekrose oder akzidenteller Nekrose zu unterscheiden [121]. Erst in

jüngster Zeit wurde der molekulare Signalweg fortlaufend entschlüsselt, der dem seit längerem bekannten nekrotischen TNF-α- und FasL-induzierten Zelltod in der Fibroblasten Zelllinie L929 zugrundeliegt. Die Inhibition von Caspasen hemmte nicht deren Zelltod, sondern sensibilisierte die Zellen dahingehend, unter massiver Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [122, 123]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den FasL-induzierten RIP1-abhängigen Zelltod in MEF-Zellen (engl. mouse embryonic fibroblasts) beobachtet, weshalb diese Form des programmierten Zelltodes auch caspaseunabhängiger Zelltod genannt wird [11].

Necroptose bedient sich der gleichen Rezeptoren wie die extrinsische Kaskade der Apoptose (d.h. Fas, TNFR1, TRAILR) [121] als auch der Rezeptoren für pathogene Noxen (engl. pathogen recognition receptors, PRR) [22, 57]. Hierbei kommt der RIP-Molekülfamilie entscheidende Bedeutung zu. RIP1-Knockoutmäuse zeigten einen normalen Phänotyp zum Zeitpunkt der Geburt, verenden jedoch wenige Tage danach an massiv erhöhter Apoptose sowohl im lymphoiden als auch adipösen Gewebe, was über die Pro-Survival-Funktion von RIP1 über NFκB erklärt wurde [38, 114]. Die Aktivierung von NFκB ist unabhängig von der Kinase- aber abhängig von der Intermediärdomäne von RIP1 [114]. Hierbei dient RIP1 nach Anlagerung an den TNFR1 als Gerüstprotein (engl. Scaffolding protein) für die Anlagerung von Ubiquitinketten durch TRAF2 [47]. Über eine Interaktion mit NEMO (engl. NFκB essential modulator) [134] und Rekrutierung des TAK1-TAB1-TAB2-Komplexes [70, 109] wird daraufhin das NFκB-Signal getriggert. Auch für die TLR-3 (engl. Toll-like receptor-3), nicht aber TLR-4 vermittelte NFκB Signalbildung ist RIP1 essenziell [69].

Im Zuge der TNF-α-induzierten Apoptose wird RIP1 nach Deubiqutinylierung über die Enzyme Cezanne und CYLD (Cylindromatosis) [121] die Anlagerung an den zytoplasmatischen Signalkomplex II (s.o.) ermöglicht. Nach der Spaltung von RIP1 an Position Aspartat-324 durch Caspase-8 wird die apoptotische extrinsische Signalkaskade eingeleitet [51]. Deletion oder Inhibition von Caspase-8 jedoch verhindert zelltypabhängig die RIP1 Spaltung, wodurch die Bildung eines alternativen Komplex-II ermöglicht wird (auch „Necrosom“ genannt [121]). Die Rekrutierung von RIP3 erfolgt in diesem Zuge über das in RIP1 und RIP3 vorhandenen RHIM (engl. RIP homotypic interaction motif), was zu einer gegenseitigen Phosphorylierung der Proteine durch deren Kinasedomäne führt

[108]. RIP3 wird eine entscheidende Steuerungsfunktion im Sinne eines molekularen Schalters bei der Initiation der nun folgenden necroptotischen Signalkaskade beigemessen [132]. Bis jetzt ist es nur gelungen, einen spezifischen Inhibitor für die Kinasefunktion von RIP1 zu entwickeln (Necrostatin-1), der dann auch die necroptotische Kaskade hemmt [15, 16]. Einschränkend ist zu erwähnen, dass auch RIP1/3-unabhängige Formen der kontrollierten Nekrose beschrieben wurden [118, 133].

Necroptose, wenn auch noch nicht von allen Experten als einheitlicher Begriff verwendet [43], ist bis heute bei zahlreichen Erkrankungsbildern nachgewiesen, so z.B. ischämischer Hirnschädigung [12, 16, 74], retinaler Ischämie-Reperfusionschädigung [95], traumatischer Hirnschädigung [131], myokardialer Ischämie [102], akutem Nierenversagen [52], SIRS und Sepsis [18, 53]. Je nach Modell ergab sich hierbei eine protektive Wirkung durch die Hemmung der Kinasenfunktion von RIP1 oder durch RIP3-Deletion. Auch die Kombination antiapoptotischer und antinecroptotischer Strategien ist experimentell untersucht worden [130].

Es wird vermutet, dass die Necroptose als back-up-Mechanismus neben der Apoptose entstand. Dies bezweckt sowohl eine antineoplastische Schutzfunktion als auch einen Schutz vor pathogenen Viren, deren Transkriptionsprodukte spezifisch die Apoptose hemmen [14, 118]. Einige Viren umgehen dies, indem sie zusätzliche RIP3-Inhibitoren synthetisieren [118].

1.4 Pathomechanismus von ALI und Sepsis

Bereits früh beschrieben Bachhofen und Weibel strukturelle zelluläre Veränderungen im Lungengewebe von Patienten mit akuter Lungenschädigung, deren Korrelat als Apoptose von Typ-II Epithelzellen erkannt wurden [2]. Diese Entdeckung war wegbereitend für die pathomechanistischen Überlegungen der sogenannten Epithelzellhypothese. Alveolare Typ-I Epithelzellen kleiden als wichtiger Bestandteil der alveolokapillären Barriere 90 % der Alveolaroberfläche aus. Ihre Regeneration erfolgt aus Typ-II Epithelzellen, die zwar nur 10 % der auskleidenden Zellschicht ausmachen, aufgrund ihrer Regenerationsfunktion und Surfactantproduktion allerdings unverzichtbar sind [126]. Es konnte gezeigt

werden, dass ein stumpfes Thoraxtrauma alleine ausreichend war, Apoptose in Typ-II Epithelzellen zu induzieren [49]. Es wurde vermutet, dass unter anderem Mediatoren aktivierter Alveolarmakrophagen hierbei eine Rolle bei der Aktivierung des inflammatorischen sowie extrinsischen apoptotischen Signalweges über CD95 (Fas-Rezeptor) spielen [101]. Allerdings waren auch in Makrophagen-defizienten Tieren inflammatorische Reaktionen nach Fas-Aktivierung durch intratracheale Instillation eines agonistischen Antikörpers messbar [81], was für die Existenz zusätzlicher Mediatorquellen spricht [54]. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ALI/ARDS-Patienten erhöhte Werte des Fas-Liganden (FasL) messbar waren [63]. Inkubation der BALF von ARDS-Patienten bewirkte hierbei eine Apoptoseinduktion in kultivierten distalen Fas-exprimierenden Alveolarepithelzellen. In Patienten mit tödlichem Ausgang der akuten Lungenschädigung waren hierbei durchweg höhere FasL-Level messbar, als bei Überlebenden [63]. Fas oder FasL-defiziente Mäuse wiesen geringere lokale apoptotische und inflammatorische Parameter in Reaktion auf einen Double-Hit von hämorrhagischem Shock und CLP-induzierter Sepsis auf [81]. Diese Effekte scheinen auf molekularer Ebene durch NFκB vermittelt zu werden und waren nicht nur durch Fas, sondern auch TNF-α induzierbar [26]. Die pharmakologische Inhibition der Apoptose auf lokaler Ebene der Lungenepithelzellen scheint daher ein vielversprechender therapeutischer Ansatz, der dem Erhalt der alveolokapillären Barriere dienlich sein könnte. Durch die intratracheale Instillation von zVAD-fmk konnten Kawasaki et al. eine Reduktion der LPS-induzierten Lungenzellapoptose beobachten [37]. Molekulargenetische Adressierung des todesrezeptorinduzierten apoptotischen Signalweges oder von Chemokinen mittels siRNA bewirkte eine Reduktion der Zerstörung der alveolokapillären Barriere und strukturell-histologischen Integrität des Lungengewebes [56, 68, 79, 82].

Ein wichtiger Mechanismus der Sepsis scheint die in vielen Organsystemen beobachtbare Apoptose von endothelialen, epithelialen und der immunologischen Abwehr dienenden Zellen zu sein, wie in experimentellen Modellen von Sepsis gezeigt werden konnte [30]. Der adoptive Transfer zusätzlicher apoptotischer Zellen erhöhte hierbei die Mortalität [31], die Überexpression des antiapoptotischen Proteins BCL-2 oder die Applikation des Breitspektrum-Caspaseinhibitors zVAD-fmk jedoch verringerte die Sterblichkeit im gleichen

Mausmodell [33, 34]. Die pharmakologische Inhibition der Apoptose sowohl auf lokaler als auch systemischer Ebene bietet deshalb eine interessante Ansatzmöglichkeit in der Behandlung dieses deletären Krankheitsbildes [61, 79, 129].

Neben dieser apoptotischen Komponente ergaben sich in jüngster Zeit allerdings auch Hinweise darauf, dass alternative Formen des Zelltodes (s.o.) bei der Genese von SIRS und Sepsis involviert sind. Die Inhibition von Caspasen mit zVAD-fmk in einem TNF-α-induzierten Schockmodell führte zu einer Verschlechterung des Erkrankungsbildes, was mit einer verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einherging [9]. McNeal et al. formulierten 2011 die Hypothese, dass die systemische Gabe von Necrostatin-1 oder RIPK1 siRNA die sepsisassoziierte Mortalität von Mäusen reduzieren könnte, wenngleich dies in ihrem CLP-Modell nicht bestätigt werden konnte [66]. Duprez et al. zeigten jedoch kurz darauf, dass in ihrem Modell des TNF-α-induzierten systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) eine Deletion der Exekutionscaspasen-1/-3/ und -7 unwirksam, eine Deletion von RIPK3 jedoch wirksam vor der überschießend proinflammatorischen Reaktion und der Freisetzung von DAMPs (engl. damage-associated molecular patterns) schützte [18]. Die protektive Wirkung der Inhibition des necroptotischen Signalweges bestätigte sich in ihrem Modell des TNF-α-induzierten SIRS für die Applikation von Necrostatin-1 sowie bei der CLP-induzierten Sepsis für die systemische Deletion von RIPK3 [18]. Linkermann demonstrierte vergleichbare Ergebnisse in seinem Modell des TNF-α-induzierten Schocks in Bezug auf RIPK3-Deletion, jedoch konträre Effekte in Bezug auf die Necrostatin-1 Applikation [53]. In beiden Arbeitsgruppen zeigte sich jedoch die vorbekannte Aggravation des Schocks durch TNF-α mit dem Pancaspaseninhibitor zVAD-fmk. Dies zeigt, dass keine einfache Übertragung der aus *in vitro* Versuchen vorbekannten pathomechanistischen Zusammenhänge in das *in vivo* Setting möglich ist und modell- und methodenabhängige Variablen berücksichtigt werden müssen. Es bleibt weiterhin unklar, welche Zellpopulationen in den einzelnen Settings zur Necroptose befähigt sind, welche Zielorgane den wesentlichen Beitrag zur Aggravation der Inflammation und Mortalität leisten und in wieweit diese Beobachtungen auch auf andere Trauma- oder Sepsismodelle übertragbar sind. Trotz der teilweise disputablen Datenlage gibt es bereits zum heutigen Zeitpunkt

ernsthafte Überlegungen, Necrostatin-1 als spezifischen RIPK1-Inhibitor mit seiner necroptosehemmenden Wirkung in Phase-I Studien aufzunehmen [53].

1.5 Offene Fragen und Zielsetzung der Studie

Es ist derzeit noch unklar, ob neben dem anerkannten Konzept der Apoptose von Lungenepithelzellen noch andere Formen von Zelltod in der Pathophysiologie von ALI/ARDS involviert sind. Auch ist noch offen, welche Relevanz die einzelnen Komponenten der intrazellulären todesrezeptorvermittelten Signalwege bei der Zerstörung der alveolokapillären Barriere haben und wie deren Kontribution zu Inflammation und Lungenepithelzelltod im *in vivo* Setting ist [62].

Ziel dieser Studie ist deshalb, in einem klinisch relevanten Modell der traumainduzierten septischen Lungenschädigung die Rolle des ubiquitären Adaptermoleküles RIPK1 und dessen Rolle bei der Inflammation, Apoptose und Zerstörung der alveolokapillären Barriere zu untersuchen. Auch soll eine mögliche Involvierung eines alternativen necroptotischen Zelltodmechanismus im Zellmodell näher beleuchtet werden.

Folgende Hypothesen liegen den Versuchsansätzen zu Grunde:

Hypothese 1: Die Reduktion von RIPK1 (einem wesentlichen Mediator zellulärer Necroptose) in pulmonalen Epithelzellen führt zur einer Abmilderung der traumainduzierten septischen Lungenschädigung in einem klinisch relevanten Double-Hit Modell.

Hypothese 2: Die Reduktion von RIPK1 (einem wesentlichen Mediator zellulärer Necroptose) in einem Zellkulturmodell immortalisierter alveolärer Lungenepithelzellen und Makrophagen beeinflusst die Zelltodrate und Freisetzungen inflammatorischer Zytokine nach Todesrezeptorstimulation.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien

Die Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich Co. (München) bezogen.

2.1.2 siRNA und Primer

Die RIPK1 siRNA Konstrukte (Sequenz des Einzelstrangs 5‘-GAAUGAGGCUUACAACAG-3‘) wie auch die siRNA der Kontrollen, welche keine Interferenz mit einer *in vivo* translatierten mRNA besitzt (non-targeting (nt), Sequenz des Einzelstrangs 5‘-AUGUAUUGGCCUGUAUUAGUU-3‘) wurden von Dharmacon Inc. (Lafayette, Colorado, USA) bezogen. Unter Zuhilfenahme des BLAST®-Algorithmus [98] wurde zuvor sichergestellt, dass von der RNA-Interferenz durch die Sequenz der siRNA keine weiteren messenger RNAs außer der von RIPK1 betroffen sind.

Für die RTq-PCR-Analyse wurden folgende Primersequenzen von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert:

-	RIPK1:	forward	5‘-ATGGATTTGTCATCCTGAAA-3‘
		reverse	5‘-TGTCTCAGTCTGTGCATCAT-3‘
-	18s:	forward	5‘-ACAGAAGGATGTGAAGGATG-3‘
		reverse	5‘-GAATTTTCTTCAGCCTCTCC-3‘
-	Gnb2L:	forward	5‘-CACCCCAGTGTACCTCTTT-3‘
		reverse	5‘-ATACTCGCACCAAGTTGTCT-3‘

Hierzu wurden nach online Recherche der DNA-Sequenzen der jeweiligen Zielgene mit dem Ensembl online Tool [107] (Wellcome Trust Sanger Institute und European Bioinformatics Institute, Hinxton, UK) exonüberspannende Primersequenzen mit dem Primer3-Programm (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA) [96, 117] generiert und anschließend zur Kontrolle der Spezifität der Sequenzen erneut dem BLAST®-Algorithmus unterzogen. Die zu erwartenden Primerprodukte wurden mit dem BiSearch Programm (Institute of Enzymology, Budapest, Ungarn) kontrolliert [45, 115].

2.1.3 Zelllinien und Kulturmedien

Für die Zellversuchsreihen wurden immortalisierte murine Alveolarmakrophagen (MHS Zelllinie, ATCC CRL-2019), murine Lungenepithelzellen (MLE12 Zelllinie, ATCC CRL-2110) und murine Fibroblasten (L929 Zelllinie, ATCC CCL-1) verwendet (alle von LGC Ltd., Middlesex, UK). Als Kulturmedium (Vollmedium) wurde für die L929 Zelllinie Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) mit einem Zusatz von 10% nicht-hitzeinaktiviertem FCS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1 mM L-Glutamin (Gibco®) und 25 mM HEPES (Gibco®) verwendet. Die MLE12 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F12 (Gibco®) mit Zusatz von 2 % FCS, 10 mM HEPES, 30 nM Natriumselenit, 10 nM Hydrocortison, 10 nM ß-Estradiol, 0,01 mg/ml Apotransferrin (Gibco®) und 0,005 mg/ml Insulin kultiviert. Schließlich wurde für die MHS Zelllinie ein Medium bestehend aus RPMI 1640 (ATCC, Manassas, USA) mit 10% FCS und 1 mM nicht-essenziellen Aminosäuren (Gibco®) verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Medien mit einem antibiotischem Zusatz aus 100 I.U. Penicillin und 100 µg Streptomycin (Gibco®) pro ml versetzt. Für sämtliche Zellversuche wurden Kulturbedingungen von 37 °C in 5%-iger CO_2-Atmosphäre (Inkubator HERACELL 150i, Thermo Fisher Scientific) gewählt. Die Lösung adhärenter Zellen aus den Zellkulturflaschen (80 cm^2, Filter Cap, NUNC GmbH & Co. KG, Wiesbaden) erfolgte mit 2,5 ml 0,5%-igem Trypsin-EDTA (Gibco®).

2.2 Vorarbeiten

2.2.1 Transfektionsoptimierung

Zur Optimierung der Transfektionbedingungen für die späteren RNA-Interferenzversuche wurde das Cell Line Optimization Nucleofector® Kit (Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz) verwendet. Hierzu wurden die Zellen nach vorheriger Kultivierung und mindestens zweimaliger Zellpassage in antibiotikafreiem Medium trypsiniert, mit einer Neubauer-Zählkammer (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) ausgezählt, und jeweils 3 Millionen Zellen in einem 15 ml Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, USA) 10 min bei 90-facher Erdbeschleunigung (x g) zentrifugiert und mit 100 µl des Transfektionsreagenzes sowie 2 µg des mitgelieferten pmaxGFP® Vectors versetzt und in einer Transfektionsküvette mit dem Nucleofector™ 2b Device (Lonza Group Ltd.) transfiziert. Nach Rekonstitution der transfizierten Zellen mit

500 µl des jeweiligen vorgewärmten Vollmediums wurden die Zellen in 6-Well Platten (NUNC GmbH & Co. KG, Wiesbaden) mit 1,5 ml Vollmedium ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5%-iger CO_2 Atmosphäre inkubiert. Darauffolgend wurden der Mediumüberstand der Wells abgenommen, die adhärenten Zellen mit 500 µl EDTA-Trypsin über 5 min gelöst, anschließend mit 1 ml Medium geblockt und in ein Polystyrol-FACS-Röhrchen (Becton Dickinson & Company) überführt. Nach zweimaliger Zentrifugation von 5 min bei 4°C und 500 x g sowie Resuspension in DPBS (Gibco®) wurden die Zellen in FACS-Puffer (aus Annexin V-FITC/7-AAD Kit, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) resuspendiert und die Fraktion der GFP-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt mit dem BD FACSCanto™ II System (Becton Dickinson & Company) und der BD FACSDiva™ Software Version 6.1.2 (Becton Dickinson & Company).

2.2.2 RIPK1 siRNA Transfektion von MHS und MLE12 Zellen

Für die MLE12 Zelllinie wurde das Amaxa Cell Line Nucleofector™ Kit V, für die MHS Zellen das Kit L (beide Lonza Group Ltd.) in Verbindung mit dem Transfektionsprogramm T-030 verwendet. Das Protokoll der siRNA Transfektion gleicht dem unter 2.2.1 beschriebenen Protokoll zur Transfektionsoptimierung. Anstelle des GFP Vectors wurden pro 1 Mio. Zellen 150 pmol RIPK1 siRNA hinzugegeben. Nach dem Aussäen der Zellen in 6-Well Platten und Ablauf von 12, 24 und 36 h Inkubationszeit wurden die Zellen jeweils trypsiniert und ausgezählt. Für die Western Blot Analyse wurden 1,2 Mio. Zellen 20 min auf Eis lysiert in 100 µl RIPA-Puffer, bestehend aus 1% Igepal® CA-630, 0,5% Natriumdesoxycholsäure und 0,1% SDS. Zur Verhinderung von proteinerger Degeneration wurde ein Proteaseinhibitorgemisch, bestehend aus 104 mM AEBSF 80 µM Aprotinin, 4 mM Bestatin, 1,4 mM E-64, 2 mM Leupeptin und 1,5 mM Pepstatin A hinzugegeben. Das Lysat wurde 15 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand bei -80°C weggefroren. Für die RTq-PCR Analyse wurden 50000 Zellen mit 100 µl des Cell Lysis Buffer (aus dem RNeasy Microprep Kit, Qiagen GmbH, Hilden) sowie 0,7 µl 2-Mercaptoethanol versetzt.

2.2.3 Western Blot und PCR-Kontrolle der RIPK1 siRNA Transfektion der Zellen

Die RNA Extraktion erfolgte weiter nach dem Protokoll des Absolutely RNA® Microprep Kits (Stratagene, La Jolla, USA). 6 µl des dabei gewonnenen RNA-Eluats wurden mit dem AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene)

aufgearbeitet, indem sie mit 10 µl first strang master mix, 3 µl oligo (dT) Primer und 1 µl Affinity Script RT/RNase Block enzyme mixture versetzt und folgendes cDNA Syntheseprogramm in 0,2 ml Well-Platten (Thermo Fisher Scientific) mit dem Thermozykler Mx3000P QPCR System (Stratagene) und dem Computerprogramm MxPro Version 4.01 (Stratagene) vollzogen wurde: 5 min bei 25°C für das Primer Annealing, 30 min bei 42°C für die cDNA Synthese und 5 min bei 95°C zum Beenden der Synthesereaktion.

Die eigentliche RTq-PCR im Anschluss an die reverse Transkription wurde mit dem Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix Kit (Stratagene) durchgeführt. 2 µl des Template Stranges aus obiger cDNA Synthesereaktion wurden jeweils mit 12,5 µl SYBR® Green QPCR Master Mix, 3,75 µl einer 1 µM forward und reverse Primerlösung, 0,375 µl eines 30 nM ROX™ Referenzfarbstoffes sowie 2,63 µl DEPC-behandeltem Wasser versetzt und folgendem Amplifikationsprogramm im Thermozykler unterzogen: 1 Zyklus: 10 min bei 95°C, 40 Zyklen: 30 sec 95°C, 60 sec 55°C, 30 sec 72°C, 1 Zyklus: 60 sec 95°C, 30 sec 55°C, 30 sec 95°C. Die Auswertung erfolgte mit der LinRegPCR Software (Heart Failure Research Center, Amsterdam, Niederlande) [92]. Hierbei wird über eine lineare Regressionsanalyse der Amplifikationszyklen der jeweiligen PCR-Ansätze die Effizienz eines individuellen Ansatzes errechnet. Als Koordinaten, die den Verlauf eines Amplifikationszykluses beschreiben, dienen hierfür die Fluoreszenzrohdaten der PCR-Reaktion, welche mittels einer Microsoft®-Excel®-Tabelle (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) in das LinRegPCR Programm importiert wurden. Nach der Regressionsanalyse wurden die Effizienzwerte, sowie die individuellen Werte für die Threshold Cycle (C_T) von dem LinRegPCR Programm wiederum in ein Microsoft®-Excel®-Dokument exportiert zur weiteren Verarbeitung. Die Threshold Cycle sind dabei definiert als die Zyklen, bei dem die gemessene Fluoreszenz erstmals über einen automatisch vom Thermozykler festgelegten Referenzwert ansteigt, wobei manuell kontrolliert wurde, ob die festgesetzten Grenzwerte innerhalb der log-Phase der Amplifikationskurven und signifikant unterhalb der Plateauwerte lagen.

Das Ausmaß des Knockdowns wurde gemäß folgender Formel berechnet [89]:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta \text{CP}_{\text{target}}(control - sample)}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta \text{CP}_{\text{ref}}(control - sample)}}$$

Wobei E für die individuellen Effizienzen des Zielgenes RIPK1 (target) oder des Housekeeping-Gens (ref), ΔCP für die Differenz der Crossing Points (entspricht hier Threshold Cycle) der 0 h Kontrolle (control) und der Proben zu den jeweiligen Analysezeitpunkten (sample).

Für die Darstellung des Knockdowneffektes auf Proteinebene wurden den obigen in RIPA-Puffer und Proteaseinhibitor gelösten Zelllysate zunächst 10 µl zur Proteinbestimmung mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, siehe 2.3.7) entnommen. Hiernach wurden Probenvolumina mit äquivalenten Proteinmengen von 15 µg auf 20 µl Gesamtvolumen mit Aqua dest. verdünnt, mit 15 µl Sample Buffer (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad Inc., Berkely, USA) und 5% 2-Mercaptoethanol versetzt und 7 min bei 95°C in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß (Eppendorf AG, Hamburg) auf einem Heizblock denaturiert. Es folgte eine Elektrophorese in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel bestehend aus 3,3 ml Rotiphorese® (Carl Roth GmbH & Co. KG), 2,5 ml Lower Buffer (Tris-HCL/SDS; pH 8,8), 4,2 ml Aqua dest., 30 µl 25% APS und 5 µl TEMED, welches nach Polymerisierung zwischen zwei Mini PROTEAN® 3 System Glasplatten (Bio-Rad Inc.) mit einer Sammelgelmischung aus 0,8 ml Rotiphorese®; 1,25 ml Upper Buffer (Tris-HCL/SDS; pH 6,8) überschichtet wurde und senkrecht in einer Elektrophoresewanne (Bio-Rad Inc.) befestigt wurde. Als Molekulargewichts-marker diente der Full-Range Rainbow Marker (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg). Nach 2 h 45 min Elektrophorese bei 125 V (Stromregler PowerPac™ HC, Bio-Rad Inc.) in einem Laufpuffer (25 mM Tris, 20 mM Glycin, 3,5 mM SDS) wurde die Elektrophorese beendet und die Proteine des Geles zwischen zwei Zellulosefiltern (Whatman GmbH, Dassel) auf eine PVDF-Membran (Amersham Biosciences Europe GmbH) 2 h bei einer Stromstärke von 0,18 A in einer Blotting-Kammer (Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Inc.) transferiert. Als Transferpuffer diente eine Lösung aus 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS und 20% Methanol.

Für die Immunodetektion der geblotteten Proteine wurde die Membran zunächst in 5%-iger Milch, bestehend aus Milchpulver (Carl Roth GmbH & Co. KG) in TBST (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl und 2,5 mM KCl mit 0,1% Tween) für 1,5 h geblockt. Zusammen mit 5 ml einer 1:1000 verdünnten Primärantikörperlösung (Primärantikörper RIP (D93C12) XP™ Rabbit mAb, #3493, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA; in 5% Milchpulver/TBST 0,1%) wurde die Membran dann über Nacht bei 4°C auf einem Rollmischer inkubiert. Nach 3 x 15 min Waschen in TBST 0,1% auf dem Schüttler folgte eine einstündige Inkubation mit 5 ml eines 1:1500 in TBST verdünnten HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, #7074, Cell Signaling Technology Inc.) auf dem Rollmischer. Nach mehrmaligem Waschen in TBST 0,1% und abschließend TBS wurden die Membranen mit 1 ml ChemiGlow®-Reagenz (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) 1 min lang überschichtet und die Chemilumineszenz in Filmkassetten auf ECL-Hyperfilmen (Amersham Biosciences Europe GmbH) festgehalten, welche anschließend in der Entwicklungsmaschine (Eastman Kodak Company, Rochester, USA) fixiert wurden. Die Membranen wurden nach der Ablichtung lichtgeschützt in Aluminiumfolie verpackt und bei -20°C bis zum Re-Blot am Folgetag weggefroren.

Als Ladekontrolle diente ein Re-Blot der ß-Actin Proteinfraktion, welche durch die experimentellen Interventionen unbeeinflusst bleibt. Hierzu wurden die gekühlten Membranen vom Vortag in einem 50 ml Polypropylenröhrchen mit 5 ml einer 1:10 in Aqua dest. verdünnten Stripping Solution (EMD Millipore Corporation, Billerica, USA) für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer inkubiert. Nach zwei 5 minütigen Waschschritten mit TBST wurden die Membranen für 30 min in 5%-iger Milch (s.o.) auf dem Schüttelmixer geblockt. Über Nacht bei 4°C wurden die Membranen dann in 5 ml des 1:1000 in 5%-iger Milch verdünnten ß-Actin Primärantikörpers (#4967, Cell Signaling Technology Inc.) auf dem Rollmischer inkubiert. Die Waschschritte und Entwicklung der Re-Blots entsprechen dem oben beschriebenen Vorgehen. Lediglich das Chemilumineszenzreagenz ChemiGlow® wurde für die Re-Blots 1:5 in TBS verdünnt, statt pur verwendet zu werden.

Die entwickelten Filme wurden schließlich per Scanner (HP Scanjet, Hewlett-Packard Company, Palo Alto, USA) digitalisiert und mit der ImageJ Software v1.46h [13] im 8-bit Format ausgewertet. Die gemessene digitale Dichte der

Bildpunkte wurde dividiert durch die Dichte der korrespondierenden ß-Actin-Bande und die dadurch erhaltenen Punktsummen mit einander verglichen.

2.2.4 Fluoreszenzfärbung transfizierter Zellen

Nach Transfektion wurden die Zellen und unbehandelte Kontrollen auf sterilen gekammerten Objektträgern (Lab-Tek II Chamber Slide, Nalge Nunc International, Naperville, USA) ausgesät, 18 h Adhärenzzeit abgewartet, der Überstand abgenommen und danach die einzelnen Wells mit jeweils 150 µl eiskaltem PBS vorsichtig gewaschen. Nach 5 minütiger Fixation mit eiskaltem Methanol und 2 maligem Waschen mit PBS wurden die Wells 1 x 4 min mit PBS, 2 x 4 min mit PBST und schließlich 1 h bei Raumtemperatur mit 1:20 in PBS verdünntem Ziegennormalserum (aus Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK) inkubiert. Der Erstantikörper (Anti-RIPK1 produced in rabbit, #SAB3500420, Sigma Aldrich Co.) wurde in einer Verdünnung von 1:200 in PBS über Nacht bei 4°C in die Wells pipettiert (je 150 µl). Nach Waschung mit PBS am 2. Tag folgte eine 1 stündige Inkubation mit dem 2. Antikörper (ebenfalls aus Vectastain® ABC Kit) welcher 1:100 in 1,5% Ziegennormalserum/PBS verdünnt wurde. Nach 3 x 5 minütiger Überschichtung mit PBS, 1 x 30 min mit TexasRed®-Streptavidin (Sigma Aldrich Co.) und 3 x 5 min PBS wurden die Wells 15 min mit jeweils 150 µl einer Bisbenzimidlösung (0,5 mg/1 Liter PBST) im Dunkeln inkubiert. Nach abschließender Waschung mit PBS wurden die Objektträger luftgetrocknet und mikroskopisch betrachtet.

2.3 Double-Hit Modell von Thoraxtrauma und Sepsis

2.3.1 Applikation der Traumata und Instillation der siRNA

Alle aufgeführten Tierversuchsprotokolle und Manipulationen wurden vom zuständigen Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Versuchsnummer 937).

Für den tierexperimentellen Teil der Studie wurden 8-10 Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld) mit einem Gewicht von durchschnittlich 21,6 g ± 1,2 g Standardabweichung verwendet. Die Versuchstiere wurden in den Ställen der Bereichstierhaltung der Tierforschungszentrale Ulm am Safranberg, Haus IV, UG, bei 21°C Raumtemperatur, 50-60 % Luftfeuchtigkeit mit 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tiere hatten prä- und postinterventionell freien Zugang zu Futter (Altromin 1314 Forti, Altromin GmbH, Lage/Lippe) und Wasser. Die Tiere wurden in 3 Gruppen eingeteilt mit je n=5-8: 1.

Sham-Gruppe, welche eine non-targeting(nt) siRNA Instillation erhielt, 2. Eine Double-Hit Gruppe, die ebenfalls nt siRNA erhielt, sowie 3. Eine Interventionsgruppe, die RIPK1 siRNA erhielt. Für die Gewinnung von Lungengewebe für die histologische Aufarbeitung wurden die gleichen Gruppen mit n=4 bearbeitet. 12, bzw. 24 h nach der polymikrobiellen Sepsis wurden die Tiere durch eine Überdosis an Narkosegas getötet und Organe, BAL und Plasma nach dem unter 2.3.2 beschriebenen Protokoll entnommen. Die Versuchsreihe wurde gänzlich in den Tierversuchslaboratorien der Bereichstierhaltung Safranberg durchgeführt. Vor jeder Intervention wurde das Gewicht der Tiere auf 0,1 g genau bestimmt.

24 Stunden vor der Applikation des Thoraxtraumas wurde die erste intratracheale Instillation von 100 µg in 100 µl sterilem PBS gelöster RIPK1- bzw. non-targeting siRNA vorgenommen, indem die Mäuse zunächst über eine volatile Spülmaskennarkose mit einem über einen Vapor (Drägerwerk AG, Lübeck) regulierten Gemisch aus 2,5% Sevofluran (Sevorane™, Abbott, Wiesbaden) und medizinischem Sauerstoff (Westfalen AG, Münster) narkotisiert wurden. Per Rotameter (Drägerwerk AG) wurde der Sauerstoffffluss auf 0,5 l pro Minute eingestellt. 100 µl siRNA-Lösung wurden pharyngeal appliziert und das Aufwachen der Tiere aus der Narkose abgewartet. Alle Versuchstiere erholten sich ausnahmslos rasch von der Instillationsprozedur.

Das stumpfe Thoraxtrauma wurde zuvor von Knöferl et al. an einem Tiermodell der Ratte charakterisiert [40]. Nach Narkotisierung der Tiere wie oben beschrieben wurden diese auf der ventralen Körperseite mittels Elektrorasierer rasiert. Auf dem Thorax wurden mit einem wasserfesten Filzstift Markierungen an Rippenbogen, Sternummitte und kaudalem Sternumende angebracht, um eine möglichst zentrale Applikation des Thoraxtraumas zu gewährleisten. Die narkotisierten Mäuse wurden unter einen Druckwellengenerator gelegt, welcher eigens in der wissenschaftlichen Werkstatt Feinwerktechnik der Universität Ulm angefertigt wurde. In Orientierung an den Markierungen am Thorax der Maus wurde der nach unten offene Druckzylinder 1,5 cm über der Brustkorbmitte der Maus zentriert. Das obere Segment des Druckzylinders war durch eine austauschbare Mylarfolie (DuPont GmbH, Bad Homburg) der Dicke 50 µm vom unteren Segment getrennt. Aus einer Gasflasche mit Druckluft für Atemzwecke (MTI Industriegase AG,

Eichingen) strömte die mit einem Druckminderer (Flaschendruckminderer Zinser, Ebersbach) auf 13 bar reduzierte Druckluft auf ein elektronisch auslösbares Hochgeschwindigkeitsventil (Hee-D-24, Festo, Esslingen), welches den Zylindersegmenten mit der Mylarfolie vorgeschaltet war. Durch Auslösung des Ventils in Inspirationsstellung des Tieres zerriss die Polyestermembran oberhalb deren kritischen Berstspannung, was zur Generation einer Druckwelle auf den Thorax führte. Nach Applikation des Traumas wurde die Maskennarkose beendet und die Tiere nach Einsetzen der Spontanatmung in den Käfig zurückgesetzt.

Weitere 12 Stunden nach dem Thoraxtrauma erfolgte eine erneute intratracheale siRNA Instillation nach obigem Protokoll.

24 Stunden nach dem ersten Trauma („first hit“) wurde eine polymikrobielle Sepsis („second hit“) wie vorbeschrieben [10, 79, 82] durch zökale Ligierung und Punktion induziert. Nach erneuter Anästhesie und Fixation der Tiere wurde über eine abdominelle Mittellinieninzision das Zökum der Tiere aufgesucht, nach außen luxiert und 2 cm proximal des Endes mit einem resorbierbaren Faden (4-0 Vicryl™ Polyglactin 910, Ethicon Inc./ Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) ligiert, ohne die Darmpassage das angrenzenden Dünndarmes zu beeinträchtigen. Mit einer 22 Gauge Kanüle wurde das Zökum proximal und distal punktiert und eine geringe Menge an Darminhalt exprimiert. Nach Reposition des Zökums wurden der peritoneale und kutane Bachwanddefekt schichtweise mit fortlaufenden Nähten und 4-0 Ethilon® II Polyamidfäden (Ethicon Inc./ Johnson & Johnson Medical GmbH) verschlossen.

Die Tiere erhielten direkt nach der Induktion der Sepsis, sowie alle 8 Stunden subcutan Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München) in einer Dosierung von 30 µg/kg KG.

Die Versuchstiere der Kontrollgruppe („sham“) erhielten zu beiden Instillationszeitpunkten 100 µg non-targeting siRNA sowie alle notwendigen Manipulationen des Thoraxtraumas und der Sepsis, einschließlich Narkose und Analgesie mit Buprenorphin. Allerdings erfuhr diese Gruppe kein Thoraxtrauma und keine Ligierung/Punktion des Zökums.

2.3.2 Gewinnung des Probenmaterials

Die Gewinnung des Probenmaterials erfolgte 12 und 24 h nach Induktion der Sepsis durch Überdosierung des Narkosegases, gefolgt von einer Abdomino-Thorakotomie mit Entblutung durch Punktion des rechten Herzens mit einer 26 G Kanüle und einer 1 ml Spritze (BD Plastipak™, Becton Dickinson & Company) mit 50 µl vorgelegtem Heparin (Heparin-Natrium Braun „Multi“ 10000 I.E./ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen). Das dadurch gewonnen Vollblut wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, auf Eis gekühlt und umgehend weiterverarbeitet. Nach Zentrifugation (15 min bei 16000 x g und 4°C) wurde der Plasmaüberstand abgenommen, aliquotiert und bis zur Analyse bei -80°C weggefroren.

Eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde entnommen, indem der rechte Hauptbronchus abgeklemmt, die Trachea freipräpariert und am oralen Ende mit einem auf einer 22 G Kanüle aufgesetztem kleinlumigen Polyethylentubus (0,58 mm Innendurchmesser x 0,96 mm Außendurchmesser, Smiths Medical International Ltd., Ashford, UK) kanüliert wurde. Über eine 1 ml Spritze wurden dann 300 µl eisgekühltes DPBS dreimalig instilliert und wieder aspiriert. Die so gewonnene BAL-Flüssigkeit wurde umgehend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 5 µl vorgelegtem Proteaseinhibitor (siehe 2.2.2) transferiert und eisgekühlt weiterverarbeitet, indem nach einem Zentrifugationsschritt (10 min bei 350 x g und 4°C) der Überstand aliquotiert und bei -80°C weggefroren wurde und das Zellpellet wie unter 2.3.7 beschrieben behandelt wurde.

Nach bronchoalveolärer Lavage wurden die beiden Lungenflügel entfernt, die rechten Ober- (für die Zytokinbestimmung), Mittel- (für die Myeloperoxidasemessung und PCR) sowie Herz- und Unterlappen (für die Western-Blot Analyse) separiert und mit dem linken Lungenflügel in einzelnen 2 ml Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff (MTI Industriegase AG) schockgefroren.

Die Tiere für die histologische Auswertung wurden analog der obigen Gruppe behandelt. Hier wurde nun jedoch nach Spülung des Lungenkreislaufs mit eiskaltem PBS und Freilegung der Trachea diese mit einer 20 G Venenverweilkanüle (Vasofix®, B.Braun Melsungen AG) kanüliert und über ein Dreiwegehahnsystem (Disofix®-3, B.Braun Melsungen AG) 10%-ige Formalinlösung (37%-iges Formalin, Merck Chemicals KGaA, Darmstadt; verdünnt in DPBS) passiv instilliert bis beide Lungenflügel sichtlich gefüllt waren. Die

Trachea wurde nun mittels Bindfaden verschlossen, die beiden Lungenflügel mit dem daran hängenden Herzen aus dem Thorax luxiert und in einem 50 ml Polypropylenröhrchen (Becton Dickinson & Company) mit 15 ml 10%-iger Formalinlösung bis zur Weiterverarbeitung (siehe 2.3.8) für ca. 24 h asserviert.

2.3.3 PCR aus dem Lungengewebe

Als Verfahren der RNA-Extraktion diente das Absolutely RNA® Miniprep Kit (Stratagene). Nach dem Auftauen der kryokonservierten Lungenmittellappen wurden diese mittels Skalpell geteilt, gewogen und jeweils ca. 5 mg für die RNA-Extraktion bzw. MPO Bestimmung (s.u.) verwendet. Die Gewebsproben wurden dann in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 100 µl des Lysepuffers aus dem Miniprep Kit versetzt und auf Eis gekühlt bei 17500 Umdrehungen pro Minute (rpm) mit dem Homogenisator der Marke Ultra-Turrax T 25 (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen im Breisgau) und dem Aufsatz S25N10 (IKA®-Werke GmbH & CO. KG) so lange homogenisiert, bis keine festen Bestandteile mehr makroskopisch erkennbar waren. Das weitere Vorgehen der RNA-Aufreinigung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Die Reverse Transkription sowie die eigentliche RTq-PCR entsprach dem obigen Protokoll (siehe 2.2.3) der zellulären Vorversuche. Für die Berechnung des durchschnittlichen Knockdowns wurde das Relative Expression Software Tool 2009 (REST©2009, QIAGEN®, Venlo, Niederlande [90]) verwendet. Nach Berechnung der C_T-Werte und individuellen Efizienzen der Amplifikationszyklen von Ziel- und Housekeeping-Gen mit dem LinRegPCR Programm (siehe 2.2.3) wurden diese Werte in REST©2009 übertragen und die Expressionsraten sowie die dazugehörigen p-Werte berechnet. Dabei stützt sich das Programm auf einen nonparametrischen Randomisationstest, der keine Normalverteilung der Messwerte voraussetzt [90].

2.3.4 Western Blot aus Lungengewebe

Für die Western Blot Analyse wurden die kryokonservierten Lungenunter- und Herzlappen in 2 ml Eppendorfgefäße mit 200 µl RIPA-Puffer (s. 2.2.2) überführt. Als Proteaseinhibitoren dienten pro 1 ml RIPA-Puffer 50 µl Proteaseinhibitorcocktail (s. 2.2.2), 10 µl PMSF-Lösung (10mg/ml PMSF in Isopropanol) sowie 10 µl Natriumorthovanadat (100 mM Stock-Lösung).

Die Homogenisation erfolgte erneut gekühlt auf Eis mit dem Ultra-Turrax T 25 bei 16000 rpm. Nach 15 min Zentrifugation der Proben bei 16000 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen, aliquotiert und bis zur Analyse bei -80°C weggefroren.

Nach Proteinbestimmung mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit (siehe 2.3.7) erfolgte die Elektrophorese, Übertragung und Darstellung der Proteinbanden von RIPK1 und Caspase-3 analog dem unter 2.2.2 beschriebenen Protokoll mit folgenden Modifikationen für die Blots:

- Für RIPK1: 10 µg aufgetragene Proteinmenge pro Probe
- Für Caspase-3: 18%-iges Elektrophoresegel (6 ml Rotiphorese®, 2,5 ml Lower Buffer, 1,8 ml Aqua dest.), 60 µg aufgetragene Proteinmenge, Primärantikörper Cleaved Caspase-3 (Asp 175) Antibody #9661 (Cell Signaling Technology Inc.)

2.3.5 Zytokin ELISA der Lungenhomogenate, Plasma und BAL

Die immunologische Bestimmung der Zytokine sowie die Bestimmung des Proteingehaltes aus BAL-Flüssigkeit und Plasma konnte direkt aus dem wie unter 2.3.2 beschriebenen aufgearbeiteten Probenmaterial durchgeführt werden. Die Asservate der Lungenoberlappen wurden mit jeweils 250 µl DPBS + Proteaseinhibitorcocktail (siehe 2.2.2, 50 µl Proteaseinhibitormischung pro ml DPBS) mit dem Ultra Turrax T 25 bei 17500 rpm auf Eis gekühlt in einem 2 ml Eppendorfgefäß homogenisiert. Zur Aufspaltung von übrig gebliebenen membranösen Strukturen im Homogenat wurde dieses mittels Ultraschallpulswellengenerator (Bandelin Sonopuls HD2070, Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin; Einstellung des Amplitudenreglers auf 40%) mit 2 x 5 Zyklen gepulster Ultraschallwellen behandelt. Aus dem nach 15 minütiger Zentrifugation bei 16000 x g und 4 °C gewonnenem Überstand erfolgte die Zytokinanalyse und Proteinbestimmung nach Verdünnung in sog. Reagent Diluent (DPBS/5% BSA) (Pierce® BCA Protein Assay Kit, siehe 2.3.7).

Bei der folgenden Immunodetektion der Zytokine wurde ein indirekter ELISA gewählt, der die Antigene in Sandwich-Technik detektiert. Für die Zytokine IL-1ß, IL-6, IL-10, TNF-α und MCP-1 kam das jeweilige BD OptEIA™ ELISA Set (Becton

Dickinson & Company) zum Einsatz; für die Zytokine Fas, FasL, MIP-2, KC und G-CSF das jeweilige DuoSet® ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Für die Vorbereitung der Mikrotiterplatten (C96 Maxisorp Cert., Fa. NUNC) wurden 100 µl einer 1:180 in PBS (Fas, FasL, MIP-2, KC, G-CSF), 0,1 M Natriumcarbonatpuffer pH=9,5 ($NaHCO_3$/Na_2CO_3; für IL-1ß, IL-6, TNF-α) oder 0,2 M Natriumcarbonatpuffer pH=6 (IL-10, MCP-1) verdünnte Primärantikörperlösung (Capture Antibody) in die Wells pipettiert. Nach Verdünnung der Proben und Erstellung einer achtstufigen Standardreihe nach Herstellerprotokoll am Folgetag wurden die Platten mit 300 µl Waschpuffer (165 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,5 mM Na_2HPO_4, 2,9 mM KH_2PO_4 + 0,5 g TWEEN 20 pro Liter Aqua dest.) gewaschen (Wellwash 4 MK 2, Thermo Fisher Scientific), für 1,5 h mit Reagent Diluent geblockt und nach einem erneuten Waschschritt jeweils 100 µl der Proben (bzw. Standards) auf die Mikrotiterplatten pipettiert.

Die Inkubation mit den Proben und Standards erfolgte bei 4°C über Nacht, bevor die Platten am 3. Tag entwickelt wurden. Hierzu wurde nach einer Waschung der Mikrotiterplatten jeweils 100 µl 1:180 in Reagent Diluent verdünnte zytokinspezifische Sekundärantikörperlösung (Detection Antibody) in die Wells pipettiert und für 1 h (IL-1ß, TNF-α) oder 2 h (Fas, FasL, MIP-2, KC, G-CSF) bei Raumtemperatur inkubiert. Einem weiteren Waschschritt folgte ein Inkubationsschritt von 30 min (IL-1ß, TNF-α) oder 20 min (Fas, FasL, MIP-2, KC, G-CSF) mit 100 µl einer 1:200 in Reagent Diluent verdünnten Streptavidin-HRP-Lösung. Für die ELISAs IL-6, IL-10 und MCP-1 wurden zu diesem Zeitpunkt direkt 100 µl einer Mischung aus Detection Antibody und Streptavidin-HRP (als Zusatz zu der Sekundärantikörper-Lösung in einer Verdünnung von 1:200) pipettiert und für 1 h inkubiert. Nach Waschung und Zusatz von 100 µl einer 1:1 Mischung TMB-Reagenz (BD Pharmingen™, Becton Dickinson & Company) für 30 min in einem lichtgeschützten Raum wurde die Reaktion mit 50 µl einer 2 N Schwefelsäure (H_2SO_4) gestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte mit einem Multiwell-Photometer (Tecan Sunrise Reader) und die Zytokinkonzentration wurde mit Hilfe der Standardkurve berechnet.

2.3.6 TUNEL Färbung von Lungengewebsschnitten

Zur Visualisierung der im Zuge des apoptotischen Prozesses entstehenden DNA-Bruchstücke wurden ca. 2 µm dicke Gewebsschnitte der in Paraffin eingebetteten

Lungen der Tiere der Histogruppe mit dem *In situ* Cell Death Detection Kit TMR red (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim) gefärbt.

Hierzu wurden die unter 2.3.2 fixierten Thoraxorgane der Versuchstiere in eine Petrischale überführt, Herz und alle weiteren mediastinalen Organe entfernt und die beiden Lungenflügel getrennt in Plastikeinbettkassetten (Simport Histosette® I Tissue Embedding Cassette 45° Angle, Thermo Fisher Scientific) eingelegt. Ein fünfstündiger Waschschritt mit fließendem Wasser entfernte das überschüssige Formalin. Die anschließende Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-, 80%-, 90%-, 100%-iges Ethanol, Methylbenzoat, Toluol, Xylol und erneut 100%-iges Ethanol) wurde in dem Einbettautomaten Leica Asp200 (Leica Microsystems, Wetzlar) durchgeführt. Nach weiteren 24 h konnten die Gewebeproben in einer Ausgießstation (Microm EC -350-1, Microm, Walldorf) in Paraffinblöcke eingebettet werden, die nach Auskühlung auf einer -4°C kalten Platte mit dem Microtom (Microm HM450, Microm) in ca. 2 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträgern (Menzel-Gläser, Fa. VWR) getrocknet wurden.

Die Entparaffinisierung erfolgte durch zweimaliges Waschen der Schnitte in Xylol, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe (100%-, 90%-, 80%-, 70%-iges Ethanol) und einem Waschschritt mit destilliertem Wasser. Die Proben wurden anschließend für 15 min bei 37°C mit einem Proteinase-K-Puffer (20 µg/ml in 10 mM Tris/HCl pH=7,6) angedaut. Nach zweimal dreiminütiger Waschung mit DPBS wurde jeder Schnitt mit 50 µl einer Mischung aus Enzymesolution und Labelsolution des *In situ* Cell Death Detection Kits für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Negativkontrollen wurden nur mit Labelsolution überschichtet. Nach drei DPBS Waschschritten und 15 minütiger Kernfärbung mit Bisbenzimidlösung (0,5 mg/1 Liter PBST) im Dunkeln wurden die Schnitte erneut zweimal mit DPBS gewaschen und mit Dakocytomation Fluorescent Mounting Medium (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) überschichtet und mikroskopisch ausgewertet.

2.3.7 Messung der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe

Als Maß für den Influx neutrophiler Granulozyten (PMNs) wurde die Aktivität des Hämoproteins Myeloperoxidase [1] als wesentlicher Bestandteil azurophiler Granula reifer neutrophiler Granulozyten gemessen. Durch die bei der Probeentnahme durchgeführte Spülung des Lungenkreislauf ist die gemessene MPO-Aktivität auf PMNs zurückzuführen, die entweder bereits in den

Alveolarraum migriert sind, gerade im Prozess der Transmigration aus dem Kapillarraum über die alveolokapilläre Barriere sind oder ihre Myeloperoxidase bereits im Zuge des inflammatorischen Geschehens in die extrazelluläre Matrix der Lunge freigesetzt haben.

Für die Analyse wurde das zweite Teilstück des halbierten Lungenmittellappens in 1,5 ml eines 0,05 M Kaliumphosphatpuffers (KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH=6,0; versetzt mit 0,5 % HTAB) homogenisiert. Die Homogenisation erfolgte erneut mit dem Ultra-Turrax T 25 in einem wandverstärkten Reagenzglas (Fa. VWR, Darmstadt) auf Eis. Es folgte eine zweistündige Erwärmung im Schüttelwasserbad (SW23, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) bei 60°C. Über Nacht bei 4°C im Kühlschrank wurden die Proben eingelagert und am nächsten Tag nach Auflockerung des Sedimentes auf dem Schüttelmischer (Vortex-Genie® 2, Carl Roth GmbH & Co.) für 15 min bei 3950 x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Jeweils in Doppelbestimmung wurden 25 µl des Überstandes oder einer achtstufigen MPO-Standardreihe (Merck Chemicals KGaA) in die Wells einer 96-Well Platte (Mikrotiterplatte 96F, Fa. NUNC) pipettiert und mit 25 µl TMB (10 mg in 10 ml DMSO) und mit 200 µl einer Wasserstoffperoxidlösung (670 µl einer 0,1%-igen H_2O_2-Lösung gelöst in 40 ml eines 0,08 M Kaliumphosphatpuffers KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH=5,4) versetzt. Nach 5 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die durch die Myeloperoxidase vermittelte H_2O_2-abhängige Oxidation des TMB durch Zugabe von 50 µl einer 2 M Schwefelsäure (H_2SO_4) gestoppt. Die Absorption wurde photometrisch bei 450 nm erfasst (Tecan Sunrise Reader, Crailsheim) und die individuelle MPO-Aktivität über die Standardkurve errechnet.

Um die gemessene MPO-Aktivität auf die Masse des homogenisierten Lungengewebes zu beziehen, wurde der Proteingehalt bestimmt, indem zunächst alle Proteine des Überstandes mit 100 µl Perchlorsäure ($HClO_4$) gefällt wurden. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugation (10 min bei 3950 x g und Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen, das Sediment zweimalig mit 3 ml Aqua dest. gewaschen, aufgelockert und nach obigem Regime zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschritt folgte eine erneute Zentrifugation, wobei nach Verwerfen des Überstandes das Sediment in 2 ml 2 molarer Natronlauge (NaOH) resuspendiert wurde und das mit einem Deckel verschlossene Reagenzglas 30 min bei 56°C im Wasserbad erwärmt wurde. Jeweils in Doppelbestimmung

wurden 15 µl des gevortexten Reagenzglasinhaltes oder einer achtstufigen Proteinstandardreihe (Bovines Serum-Albumin, Fa. Sigma Aldrich) in die Wells einer 96-Well Platte (Mikrotiterplatte 96F, Fa. NUNC) übertragen und mit 300 µl eines Arbeitsreagenzes (4%-ige Kupfersulfatlösung/BCA-Reagenz im Verhältnis 1:51) versetzt (entspricht der modifizierten Methode nach Smith [103]). Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 562 nm bestimmt und mit Hilfe der Standardkurve der Proteingehalt der einzelnen Proben ermittelt.

2.3.8 BAL Proteingehalt, Zellzählung und –differenzierung

Sämtliche Proteinbestimmungen (mit Ausnahme derer für die Quantifizierung der Myeloperoxidaseaktivität) erfolgten mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit. 10 µl der Proben wurden hierzu mit Aqua dest. verdünnt (im Verhältnis 1:4 für Zelllysate, 1:10 für BAL, 1:40 für Lungengewebe und 1:120 für Plasma) und jeweils 10 µl der Verdünnung oder einer fünfstufigen Standardreihe auf eine 96-Well-Platte aufgetragen (96F, Fa. NUNC). Nach Zugabe von 200 µl eines Arbeitsreagenzes (BCA-Reagenz A/Reagenz B im Verhältnis 51:1) erfolgte nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank die Messung der Extinktion bei 562 nm am Tecan Sunrise Photometer.

Das Zellpellet der aufgearbeiteten BAL-Flüssigkeit wurde in 90 µl DPBS resuspendiert. Nach Entnahme von 10 µl der Zellsuspension wurden diese mit 90 µl Trypanblau versetzt und mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Der relative Zellgehalt der BAL (Zellzahl pro ml BAL) wurde mit Hilfe der bei der Entnahme am Versuchstier dokumentierten zurückgewonnenen Menge an Flüssigkeit errechnet. Die restlichen 90 µl Zellsuspension wurden auf einen Cytospin-Objektträger (Shandon Cytoslide®, Thermo Fisher Scientific) im Shandon Cytospin 3 (Thermo Fisher Scientific) für 3 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach 10 minütiger Lufttrocknung, gefolgt von 10 min Fixation in Methanol, wurden die Objektträger mit dem Hemacolor® Set für Schnellfärbungen von Blutausstrichen gefärbt. Nach Eindeckelung der Cytospins mit Entellan® (Merck Chemicals KGaA) und Deckgläsern (Fa. VWR) wurden die Objektträger mikroskopisch beurteilt.

2.3.9 Immunhistochemische Färbung von Lungengewebsschnitten

Für die Darstellung des regiospezifischen Knockdowns von RIPK1 wurde eine immunhistochemische Färbung an Lungengewebsschnitten durchgeführt.

Nach 5 minütiger Hitzefixierung bei 56°C wurden die Schnitte wie unter 2.3.8 angegeben entparaffinisiert. Die in Aqua dest. gewaschenen Schnitte wurden 10 min lang in vorgewärmtem Citratpuffer (2 g Zitronensäure in 1 l Aqua dest., pH=6,0) in einer haushaltsüblichen Mikrowelle bei 160 W erhitzt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit Wasser wurden die Objektträger zum Blocken endogener Peroxidasen für 10 min mit 3%-iger Wasserstoffperoxidlösung (H_2O_2) überschichtet und später 5 min mit PBST gewaschen. Die Blockung unspezifischer Bindungen erfolgte mit 50 µl Ziegennormalserum (aus Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories Ltd.; 1:20 in PBST verdünnt) pro Schnitt. Über Nacht bei 4°C erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 50 µl eines 1:200 in PBST verdünnten Primärantikörpers (Anti-RIPK1 produced in rabbit, #SAB3500420, Sigma Aldrich Co.).

Am zweiten Tag folgte 3 Waschschritten mit PBST die Inkubation mit dem 2. Antikörper (ebenfalls aus Vectastain® ABC Kit) welcher 1:100 in 1,5% Ziegennormalserum/PBST verdünnt wurde. Nach drei weiteren Behandlungen mit dem PBST-Waschpuffer wurden die Objektträger mit 50 µl des vorbereiteten ABC-Reagenzes (1 Tropfen Reagenz A/ 1Tropfen Reagenz B auf 5 ml PBS) überschichtet, welches nach 45 min mit drei PBST-Waschschritten entfernt wurde. Nach jeweils zweiminütiger Behandlung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-, 96%-, zweimal 100%-iges Ethanol) und 2 x 5 minütiger Immersion in Xylol wurden die Objektträger mit Entellan® und Deckgläsern eingedeckt und mikroskopisch beurteilt.

2.3.10 Mikroskopische Beurteilung

Alle mikroskopischen Betrachtungen wurden mit dem Mikroskop Axio Imager M1 (Fa. Zeiss, Oberkochen) und der zugehörigen Software Axio Vision Version 4.4 (Fa. Zeiss) von einer am Versuchsablauf nicht beteiligten dritten Person durchgeführt.

Transfizierte Zellen und Immunhistochemie: repräsentative Bildausschnitte wurden fotografiert und im jpeg-Dateiformat gespeichert.

BAL: 300 Zellen pro Objektträger wurden systematisch ausgezählt und nach Zelltyp klassifiziert. Mit Hilfe der berechneten relativen Zellzahl der BAL wurde der

prozentuale Anteil an alveolär eingewanderten neutrophilen Granulozyten bestimmt.

TUNEL: Zehn Gesichtsfelder pro Schnitt wurden von einer für die Gruppeneinteilung der Tiere verblindeten Person systematisch ausgezählt. TUNEL-positive Zellen wurden definiert als solche Zellen, deren Eigenfluoreszenz die unspezifische Hintergrundfluoreszenz deutlich übertrifft.

2.4 Nachbearbeitung im *in vitro* Versuch

2.4.1 Koinkubation TNF-α stimulierter Zellen mit zVAD-fmk und Necrostatin-1

MLE12, MHS sowie L929 Zellen wurden nach mindestens zweimaliger vorangegangener Zellpassage trypsiniert, mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und je 50000 Zellen in 270 µl Vollmedium in die Wells einer 24-Well-Platte (Fa. NUNC) ausgesät und 18 h Adhärenzzeit abgewartet. Am darauffolgenden Tag wurden je 30 µl in Vollmedium verdünntes TNF-α (Life Technologies Inc.), Necrostatin-1 (Nec-1), der Pancaspaseninhibitor zVAD-fmk (Bachem AG, Bubendorf, Schweiz) oder DMSO zu den Zellen gegeben. Die Inhibitoren und deren DMSO-Kontrolle wurden dabei 60 min vor TNF-α auf die Zellen pipettiert (=Pre-Treatment). Die Endkonzentration der Substrate in den Versuchsansätzen wurde dabei (bei 360 µl Endvolumen pro Kondition und Well) auf folgende Werte adjustiert (Tab. 1):

Tab. 1: Konzentrationen der Substrate im Zellversuch „Koinkubation TNFα stimulierter Zellen mit zVAD-fmk und Necrostatin-1“ (Abk.: DMSO= Dimethylsulfoxid, L929= murine Fibroblastenzelllinie, MHS= murine Alveolarmakrophagenzelllinie, MLE12= Murine Lung Epithelial Cells 12, Nec-1= Necrostatin-1, TNF-α= Tumor Necrosis Factor-alpha, zVAD-fmk= Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketon).

Zellart	c(TNF-α)	c(zVAD-fmk)	c(Nec-1)	c(DMSO)
MLE12	100 ng/ml	25 µM	75 µM	0,1 %
MHS	100 ng/ml	25 µM	75 µM	0,075 %
L929	0,05 ng/ml	25 µM	75 µM	0,1%

Folgende Versuchsgruppen wurden für alle 3 Zellreihen erstellt (n=3-4):

1. Zellen, die nur mit DMSO inkubiert wurden (Kontrollgruppe)
2. Zellen, die nur mit TNF-α inkubiert wurden

3. Zellen, die mit TNF-α und zVAD-fmk inkubiert wurden
4. Zellen, die mit TNF-α und Necrostatin-1 inkubiert wurden
5. Zellen, die mit TNF-α, Necrostatin-1 und zVAD-fmk inkubiert wurden

DMSO diente als Kontrolle, da die lyophilisierten Inhibitoren zVAD-fmk und Necrostatin-1 in DMSO gelöst und dann mit Vollmedium der entsprechenden Zellart weiter verdünnt wurden, bis die entsprechende Endkonzentration in den Wells erreicht war. TNF-α wurde in sterilem Aqua dest. gelöst. Damit in allen Versuchsgruppen gleiche Konzentrationen an den Lösungsmitteln (DMSO/Aqua dest.) der Substrate vorliegen, wurde deren Konzentration in den Gruppen 1-4 an die der Gruppe 5 angepasst.

Zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 24 h und 48 h erfolgte eine durchflusszytometrische Bestimmung der Vitalität, indem zunächst der Überstand der Wells in Polystyrol-FACS-Röhrchen (Becton Dickinson & Company) überführt und zwischenzeitlich auf Eis gelagert wurde. Die Zellen in den Wells wurden mit 100 µl Trypsin-EDTA versetzt und 5 min bei 37°C inkubiert. Mit 1 ml Vollmedium wurde die Trypsinierung in den Wells gestoppt und die Zellsuspension zu den korrespondierenden Überständen in den FACS-Röhrchen dazugegeben. Die Röhrchen wurden mit 3 ml eisgekühltem DPBS aufgefüllt und 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 3 ml DPBS resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das nun erzeugte Zellpellet wurde in 100 µl FACS-Puffer (aus Annexin V-FITC/7-AAD Kit, Beckman Coulter GmbH) mit 10 µl 7-AAD- sowie 5 µl Annexin V-Lösung versetzt. Nach 15 minütiger lichtgeschützter Inkubation bei 4°C folgte nach Zugabe von weiteren 400 µl FACS-Puffer die Messung mit dem BD FACSCanto™ II System (Becton Dickinson & Company) unter Verwendung der BD FACSDiva™ Software Version 6.1.2 (Becton Dickinson & Company).

2.4.2 Jo-2 und TNF-α Stimulation von RIPK1-gesilencten Zellen

Zur Rekapitulation der tierexperimentellen Ergebnisse *in vitro* wurde ein Modell gewählt, das die Untersuchung des Adaptermoleküls RIPK1 bei der apoptotischen und entzündlichen Reaktion muriner Lungenepithelzellen und Alveolarmakrophagen bei Stimulation mit TNF-α oder dem agonistischen Fas-Antikörper Jo-2 ermöglicht.

Folgende Versuchsgruppen wurden dabei untersucht (n=5-8):

1. Native, unbehandelte Zellen
2. Nicht-transfizierte Zellen, stimuliert mit Jo-2/TNF-α
3. Nicht-transfizierte Zellen, stimuliert mit unspezifischem IgG/der Kontrolle für TNF-α
4. RIPK1 siRNA-transfizierte Zellen, stimuliert mit Jo-2/TNF-α
5. Non-targeting siRNA-transfizierte Zellen, stimuliert mit Jo-2/TNF-α

Die nach dem unter 2.2.2 beschriebenen Standardprotokoll mit RIPK1 oder non-targeting siRNA transfizierten MLE12 bzw. MHS Zellen wurden unmittelbar nach Transfektion und Rekonstitution (mit FCS-freiem Medium) in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und erneut mittels Neubauer-Zählkammer gezählt.

Für die Bestimmung der Aktivität von Caspase-3 wurden 35000 (MLE12) bzw. 50000 (MHS) transfizierte und rekonstituierte Zellen in die Wells einer sterilen 96-Well-Platte (96F Nunclon^{TM} Δ Surface, Fa. NUNC) in Doppelbestimmung gegeben und auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit FCS-freiem Medium eingestellt. Nach einer Adhärenzzeit von 12 h wurde das Medium abgenommen und 45 µl FCS-reduziertes Medium (1% FCS-Gehalt für MLE12, bzw. 3% für MHS) in die Wells gegeben. Durch Zugabe von 5 µl einer Jo-2 bzw. TNF-α Stocklösung (0,5 mg lyophilisiertes Jo-2 gelöst in 500 µl DPBS, BD Pharmingen^{TM}) oder IgG - (0,5 mg lyophilisiertes IgG gelöst in 500 µl DPBS, BD Pharmingen^{TM}) bzw. TNF-α-Kontrolle (A. dest. + jeweiliges FCS-reduziertes Medium) wurden die Reaktionsansätze auf eine Endkonzentration 20 und 100 ng/ml (TNF-α, MLE12+MHS) bzw. 2 µg/ml und 31,25 ng/ml (Jo-2, MHS) eingestellt und bei 37°C in 5%-iger CO_2-Atmosphäre inkubiert. Nach 6 bzw. 12 h erfolgte die Abnahme des Mediumüberstandes, gefolgt von der Zugabe von 50 µl Caspase-3/7 Chemilumineszenzsubstrat (Caspase-Glo® 3/7 Assay, Promega Corporation, Madison, USA). Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte fünfminütlich über 2 h mit dem Luminoskan Ascent (Thermo Fisher Scientific), wobei die Platten zwischen den Messzeitpunkten lichtgeschützt bei 37°C inkubiert wurden.

Die quantitative Charakterisierung der Zytokinproduktion nach TNF-α-Stimulation von MLE12 Zellen erfolgte, indem analog transfizierte Zellen in einer Zelldichte von 35000 Zellen pro Well in die Löcher einer 96-Well-Platte gegeben und auf 90 µl Gesamtvolumen FCS-freies Medium eingestellt wurden. Nach 12 h Adhärenzzeit wurde ebenfalls auf 90 µl FCS-reduziertes Medium gewechselt (siehe oben) und durch Zugabe von 10 µl TNF-α Stocklösung obige Endkonzentrationen an TNF-α bzw. dessen Kontrolle erreicht. Nach analoger Inkubation wurde zu den gleichen Zeitpunkten das Medium abgenommen, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und für 10 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert. Hiernach wurde der gewonnene Überstand abgenommen, aliquotiert und bei -80°C weggefroren. Es folgte die immunologische Quantifizierung von MCP-1, MIP-2 und KC mittels ELISA nach dem unter 2.3.6 beschriebenen Standardprotokoll.

2.5 Statistik

Die Ergebnisse der PCR, MPO, ELISA, BAL-Zellzahlbestimmung, TUNEL sowie die gewonnenen Daten der Zellversuche wurden auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen untersucht. Statistische Verfahren hierfür waren der t-Test, one-way ANOVA, Kruskal-Wallis Test sowie der Student-Newman-Keuls Test oder Dunn's Test als post-hoc Testverfahren. Die Berechnung des PCR-Knockdowns erfolgte über das Programm REST©2009 wie unter 2.3.3 angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Die Darstellung der Ergebnisse in den Diagrammen zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler als Fehlerbalken. Die statistischen Berechnungen und Darstellungen erfolgten mit den Programmen SigmaStat Version 3.5 und SigmaPlot Version 11.0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Deutschland).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung des Knockdowns von RIPK1 an MLE12 Zellen

In Vorstudien erwies sich das mit dem Cell Line Optimization Nucleofector® Kit (Lonza Group Ltd.) ermittelte Transfektionsprogramm T-030 mit der Nucleofector® Solution V als am geeignetsten für die Zelllinie MLE12. Zur Überprüfung der Effizienz des Knockdowns von RIPK1 wurden MLE12 Zellen mit RIPK1 siRNA transfiziert und die spezifischen mRNA-Level bestimmt. Auf Proteinebene erfolgte eine Erfolgskontrolle durch Fluoreszenzfärbung transfizierter Zellen und Western Blot Analyse von RIPK1 im Zelllysat.

Der Knockdown auf Ebene der mRNA erreichte in drei unabhängigen Versuchsansätzen jeweils ein Maximum nach 12 h, mit abnehmendem Silencingeffekt zum 24 und 36 im Vergleich zum 0 h Zeitpunkt (Tab. 2).

Tab. 2: mRNA (messenger Ribonucleic Acid) Knockdowneffekt [in %] der spezifischen RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1) siRNA (small interfering Ribonucleic Acid) Sequenz zum 12, 24 und 36 Stunden (h) Zeitpunkt relativ zum Ausgangswert nach 0 h. Als Referenzgen diente das konstitutiv exprimierte ribosomale Gen 18s. Drei unabhängige Ansätze, Auswertung mit LinRegPCR Software und Formel nach Pfaffl et. al. [89].

Zeitpunkt [h]	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
0	0 %	0 %	0 %
12	63,57 %	36,24 %	54,38 %
24	51,78 %	25,91 %	48,39 %
36	36,77 %	14,59 %	34,24 %

Im repräsentativen Western Blot (Abb. 1) war zu allen Zeitpunkten eine ausgeprägte Reduktion des zellulären Proteingehaltes an RIPK1 erkennbar.

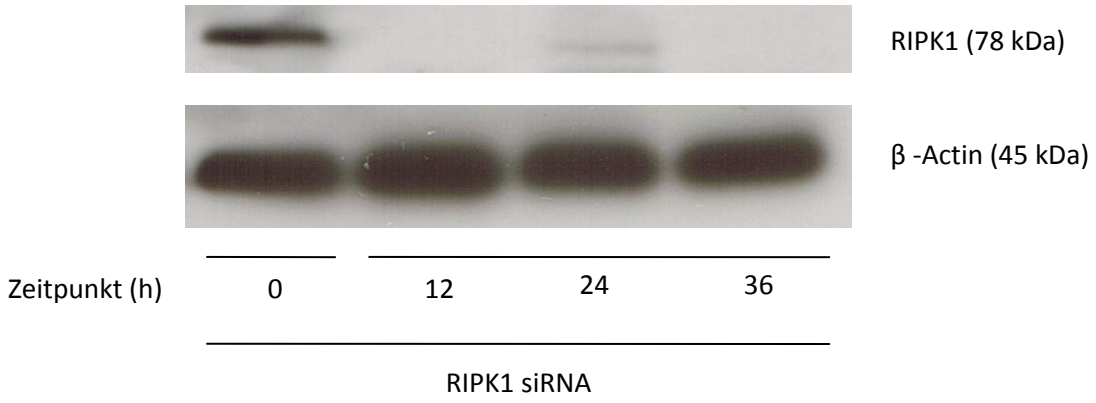


Abb. 1: Repräsentative Western Blot Analyse der RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1) (78 kDa) Expression im Lysat von MLE12 (Murine Lung Epithelial Cells 12) Zellen nach Transfektion mit RIPK1 siRNA (small interfering Ribonucleic Acid) zu den gegebenen Zeitpunkten. Als Referenz gilt die 0 h Kontrolle, zur Normalisierung dient der korrespondierende β-Actin Re-Blot (45 kDa).

In der fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der Proteinexpression nach immunhistochemischer Markierung von RIPK1 in RIPK1 siRNA behandelten Zellen (Abb. 2 D1-3) nach 18-stündiger Inkubation im Brutschrank im Vergleich zu Zellen, die mit einer non-targeting siRNA transfiziert wurden (Abb. 2 C1-3) sowie deren Kontrollen (Abb. 2 A+B1-3).

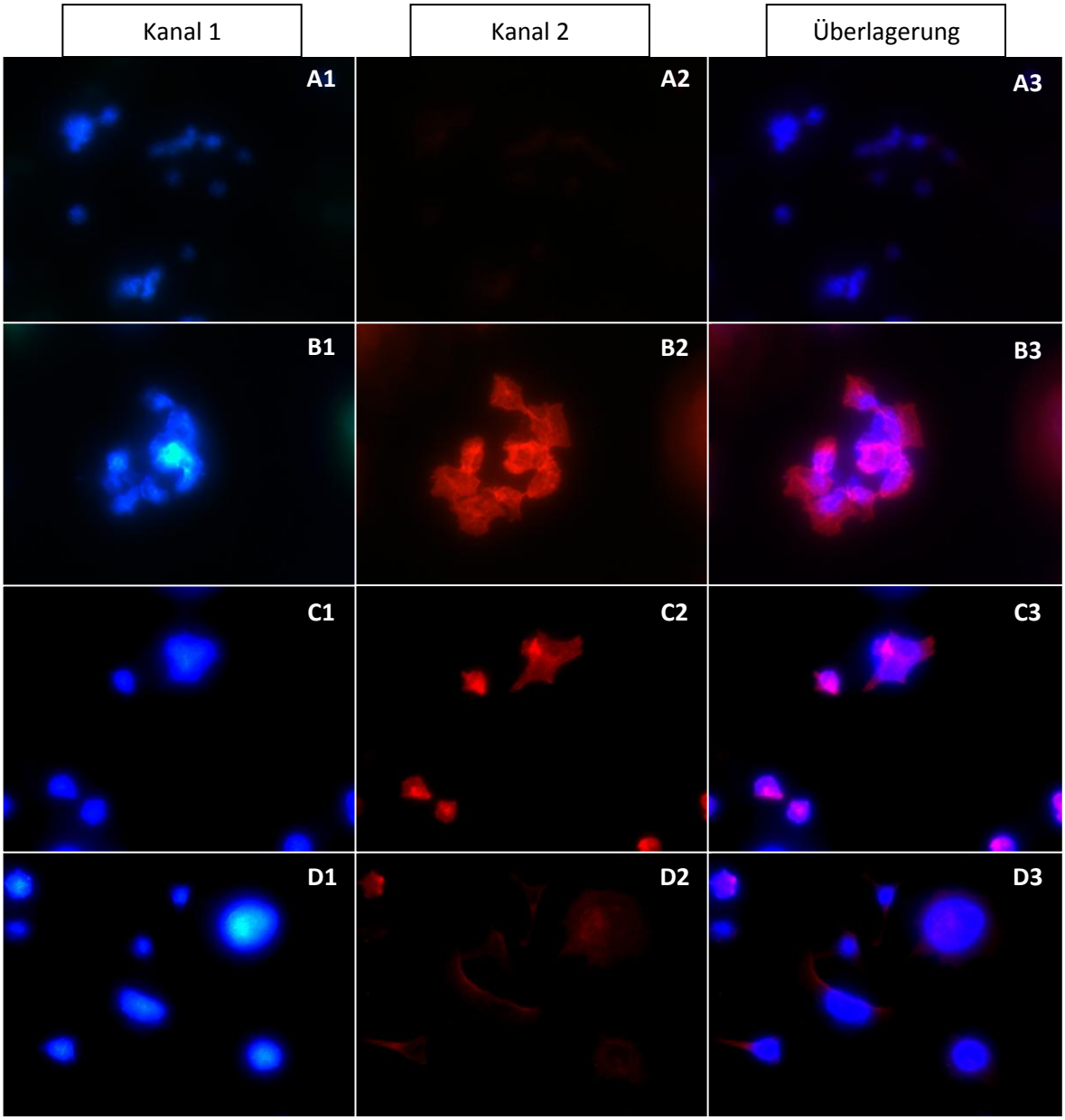


Abb. 2: Fluoreszenzmikroskopischer Befund von MLE12 (Murine Lung Epithelial Cells 12) Zellen nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C und 5%-iger CO_2-Atmossphäre. Negativkontrolle (A1-3), unbehandelte Zellen (B1-3), non-targeting siRNA (small interfering Ribonucleic Acid) (C1-3), RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1) siRNA (D1-3). Markierung mit einem RIPK1 Primärantikörper (Anti-RIPK1 produced in rabbit, #SAB3500420, Sigma Aldrich Co., München) sowie einem sekundären Antikörper (aus Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK). Bisbenzimidkernfärbung (blau, Kanal 1), Rotfluoreszenz durch TexasRed®-Streptavidin (Sigma Aldrich Co., rot, Kanal 2) sowie die Überlagerung beider Kanäle. 400-fache Vergrößerung.

3.2 Evaluation des Knockdowns von RIPK1 im Double-Hit Modell von Thoraxtrauma und Sepsis

3.2.1 RIPK1 mRNA Quantifizierung mittels RT-qPCR

Zur Quantifizierung des Knockdowneffektes von RIPK1 wurde die gesamte mRNA aus den Lungenvollhomogenaten der Versuchstiere extrahiert, gegen die Expression des Housekeepinggens Gnb2L normalisiert und die relative Expression von RIPK1 mRNA der einzelnen Versuchsgruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten verglichen.

12 Stunden nach Thoraxtrauma und Sepsis konnte eine signifikante Senkung der RIPK1 mRNA Expression im Lungengewebe der RIPK1 siRNA behandelten Gruppe im Vergleich zur Double-Hit non-targeting siRNA Gruppe festgestellt werden (p=0,019, 95%-Intervall des Standardfehlers 0,425 – 0,954). Die durchschnittliche Rate der Downregulation lag dabei bei 34,9 % (Abb. 3 A). Zum 24 h Zeitpunkt konnten keine Unterschiede der RIPK1 mRNA Expression in den beiden Versuchsgruppen mehr festgestellt werden (p= 0,357, 95%-Intervall des Standardfehlers 0,421 – 1,507) (Abb. 3 B).

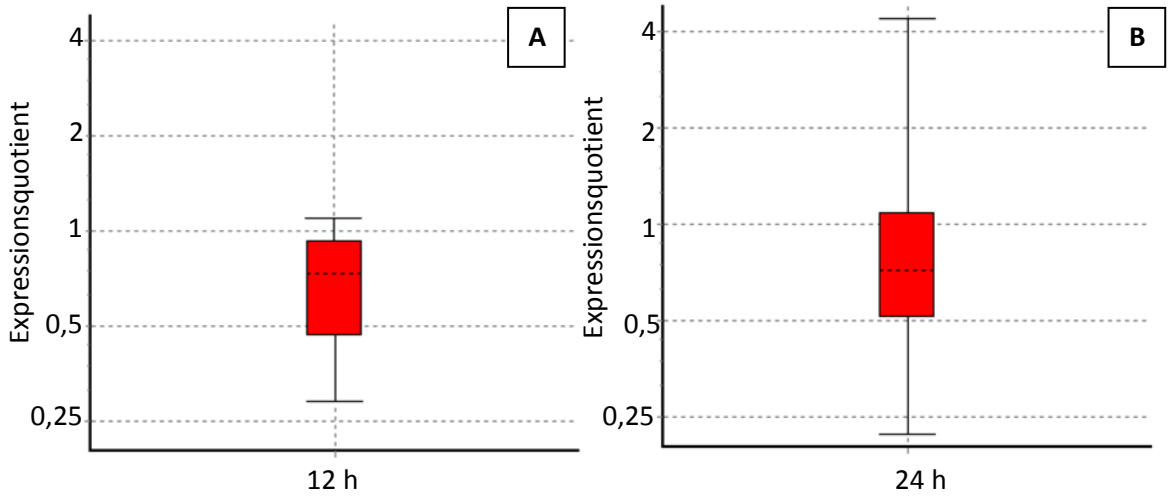


Abb. 3: Relative Expression von RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1) mRNA (messenger Ribonucleic Acid) der Double-Hit RIPK1 siRNA Gruppe versus der Double-Hit non-targeting siRNA Gruppe zum 12 (A) und 24 (B) Stunden (h) Zeitpunkt. Gruppenvergleich mittels nonparametrischem Randomisationstest mit Hilfe des Relative Expression Software Tools (REST©2009) nach Normalisierung gegen die Expression des Housekeepinggens Gnb2L (Guanine Nucleotide Binding Protein 2L) (n=5-8). p(12 h)= 0,019, p(24 h)= 0,357.

Vergleicht man die relative Expression von RIPK1 mRNA in der Double-Hit non-targeting siRNA Gruppe mit der Kontrollgruppe (sham non-targeting siRNA), so war eine Hochregulation der RIPK1 mRNA zum 12 h Zeitpunkt in der Traumagruppe um den durchschnittlichen Faktor 5,482 festzustellen (p= 0,001, 95%-Intervall des Standardfehlers 3,479 – 12,168) (Abb. 4 A). Nach 24 h war kein derartiger Unterschied mehr zu erkennen (p= 0,304, 95%-Intervall des Standardfehlers 0,776 – 2,137) (Abb. 4 B).

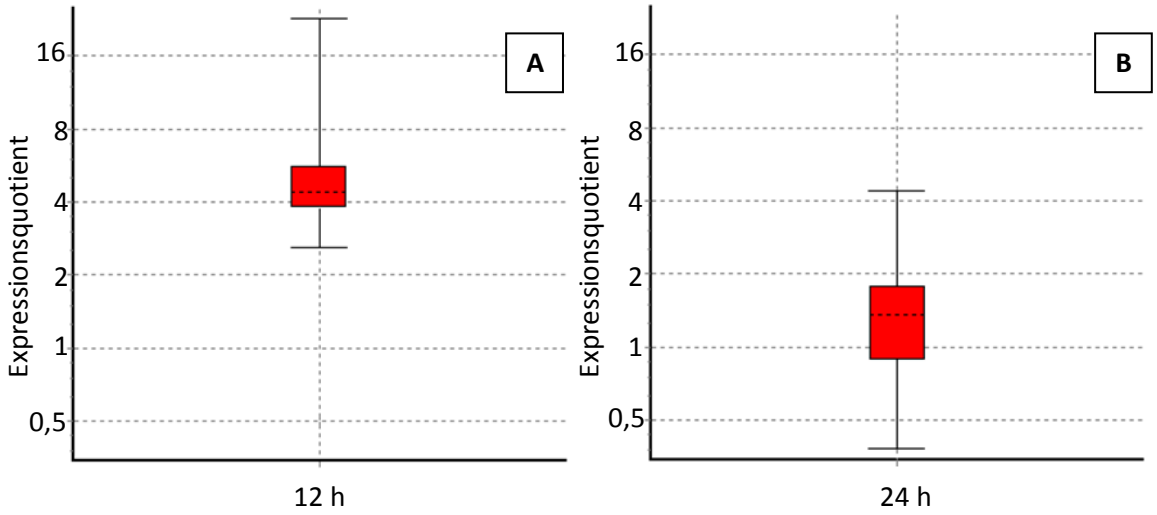


Abb. 4: Relative Expression von RIPK1 mRNA der Double-Hit non-targeting siRNA Gruppe versus der sham non-targeting siRNA Gruppe zum 12 (A) und 24 (B) Stunden (h) Zeitpunkt. Gruppenvergleich mittels nonparametrischem Randomisationstest mit Hilfe des Relative Expression Software Tools (REST©2009) nach Normalisierung gegen die Expression des Housekeepinggens Gnb2L (Guanine Nucleotide Binding Protein 2L) (n=5-8). p(12 h)= 0,001, p(24 h)= 0,304.

3.2.2 Western Blotting von RIPK1 im Lungenhomogenat

Um den Knockdowneffekt von *in vivo* applizierter RIPK1 siRNA auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Western Blots der Lungenhomogenate aller Versuchsgruppen zur Quantifizierung der RIPK1 Proteinmenge angefertigt.

Zu keinem Zeitpunkt konnte ein Unterschied der Proteinmenge zwischen der Double-Hit non-targeting siRNA Gruppe und den Kontrolltieren (sham) oder den mit RIPK1 siRNA behandelten Tieren festgestellt werden (Abb. 5).

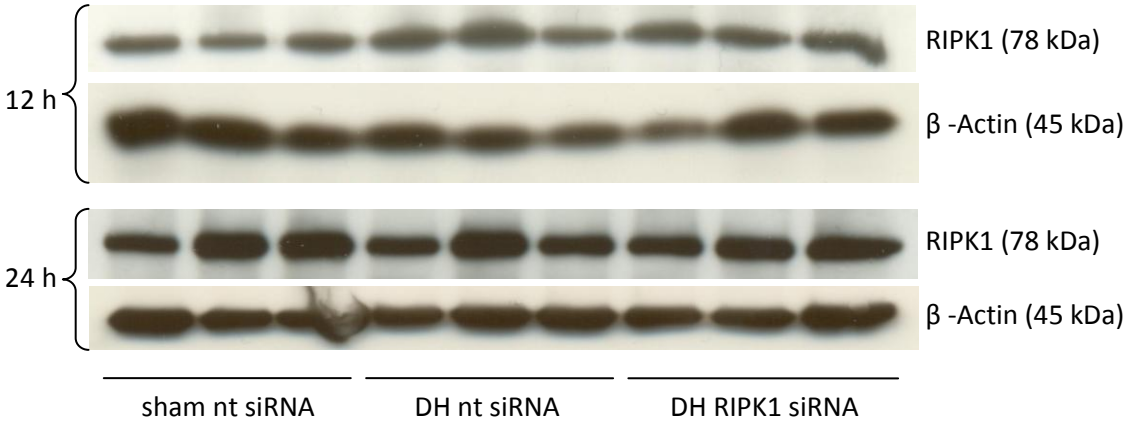


Abb. 5: Repräsentative Western Blot Analyse der RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1) (78 kDa) Expression im Lungenhomogenat der Versuchsgruppen (unbehandelte sham non-targeting (sham nt), Double-Hit non-targeting (DH nt) und Double-Hit RIPK1 (DH RIPK1) siRNA (small interfering Ribonucleic Acid)) zu den gegebenen Zeitpunkten. Zur Normalisierung dient der korrespondierende β-Actin Re-Blot (45 kDa).

3.2.3 Immunhistochemische Färbung von RIPK1 in Lungengewebe

Die instillierte siRNA affektiert ausschließlich die Bronchial- und Lungenepithelschicht, ohne die tiefer gelegenen zellulären Strukturen zu beeinflussen. Um diese lokalen Downregulationen der Zielstruktur RIPK1 auf Proteinebene zu visualisieren, wurde in paraffinfixierten Lungengewebsschnitten der Versuchstiere RIPK1 immunhistochemisch angefärbt.

In der RIPK1 siRNA behandelten Versuchsgruppe war zu beiden Zeitpunkten eine merkliche Abschwächung der Intensität des Farbreagenzes im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Double-Hit non-targeting siRNA Gruppe zu erkennen (Abb. 6).

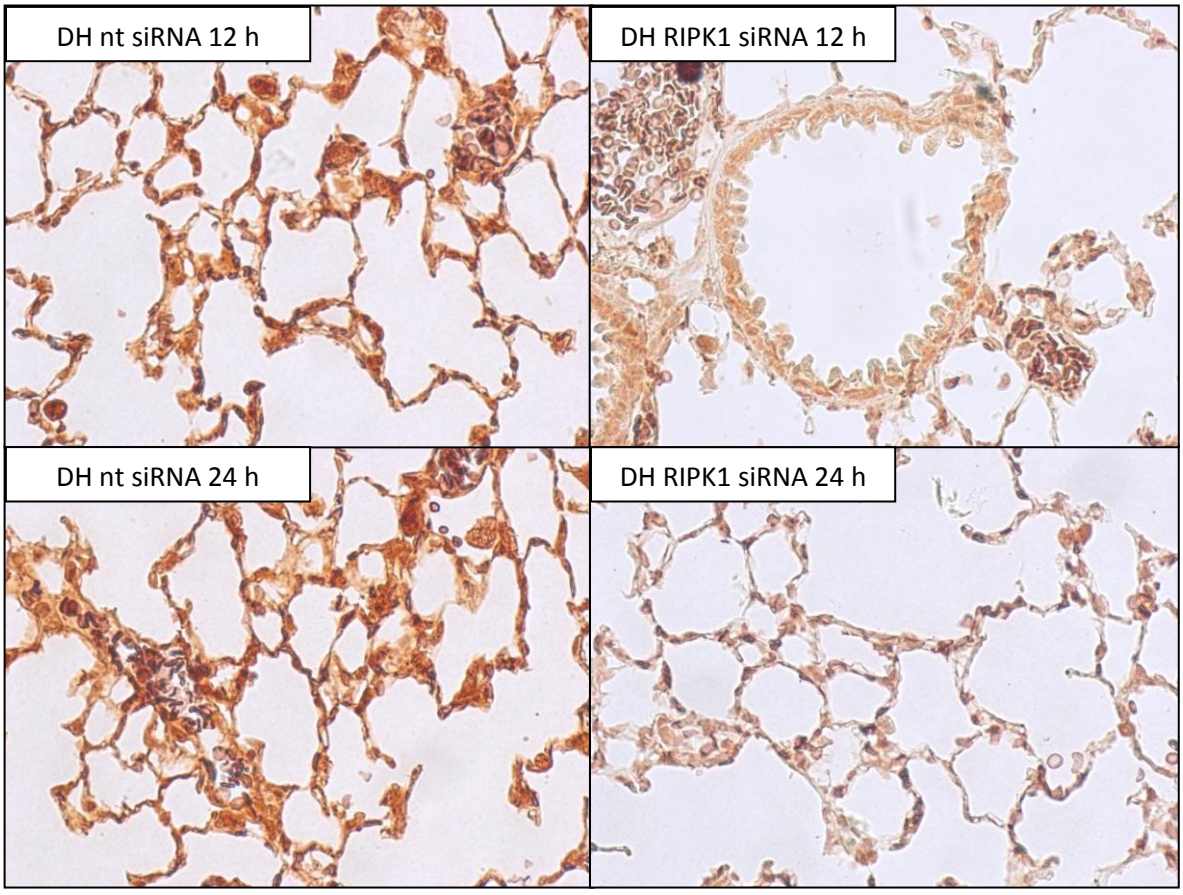


Abb. 6: Immunhistochemischer Befund RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1) gefärbter Lungengewebsschnitte von Double-Hit non-targeting (DH nt) siRNA (small interfering Ribonucleic Acid) sowie Double-Hit RIPK1 (DH RIPK1) siRNA behandelter Versuchstiere nach 12 und 24 Stunden (h). Analyse bei 400-facher Vergrößerung und Markierung mit einem RIPK1 Primärantikörper (Anti-RIPK1 produced in rabbit, #SAB3500420, Sigma Aldrich Co., München) sowie einem sekundären Antikörper und entsprechendem Farbreagenz (aus Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK).

3.3 Gewichte der Tiere

Thoraxtrauma und Sepsis stellen relevante Stressoren für die Versuchstiere dar. Infolge dessen ändert sich das Trink-, Fress- als auch das Sozialverhalten der Tiere nach den Interventionen merklich. Vor jeder Intervention sowie am Ende der Versuchsreihe wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Abnahme des Gewichtes der Tiere in den Traumagruppen zum Ende der Versuchsreihen im Vergleich zum Versuchsbeginn (Abb. 7). Die Versuchstiere der DH non-targeting siRNA Gruppe zeigten eine signifikante weitere Abnahme des Gewichtes nach 24 h im Vergleich zu Tieren der 12 h Gruppe. In der RIPK1 siRNA Gruppe war keine signifikante Abnahme des Gewichtes erkennbar.

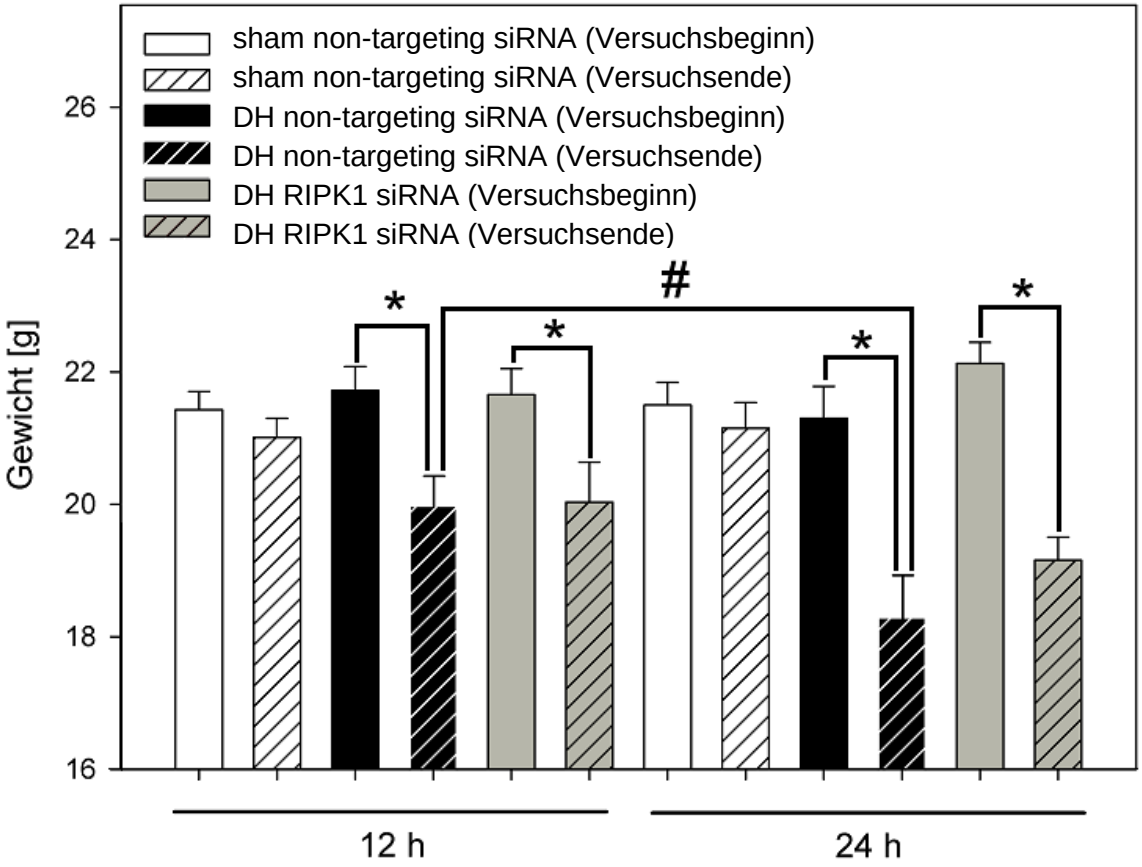


Abb. 7: Gewichte der Tiere zu Beginn des Versuches (unschraffiert) sowie 12 und 24 Stunden (h) nach Induktion der Sepsis (n=9-12/Gruppe), bzw. sham Prozedur (jeweils schraffiert). * $p < 0,05$ vs. korrespondierender Gruppe zu Beginn des Versuches, #$p < 0,05$ vs. DH non-targeting 12 h, t-Test, Mittelwert ± Standardfehler. (Abk.: DH= Double-Hit, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid).

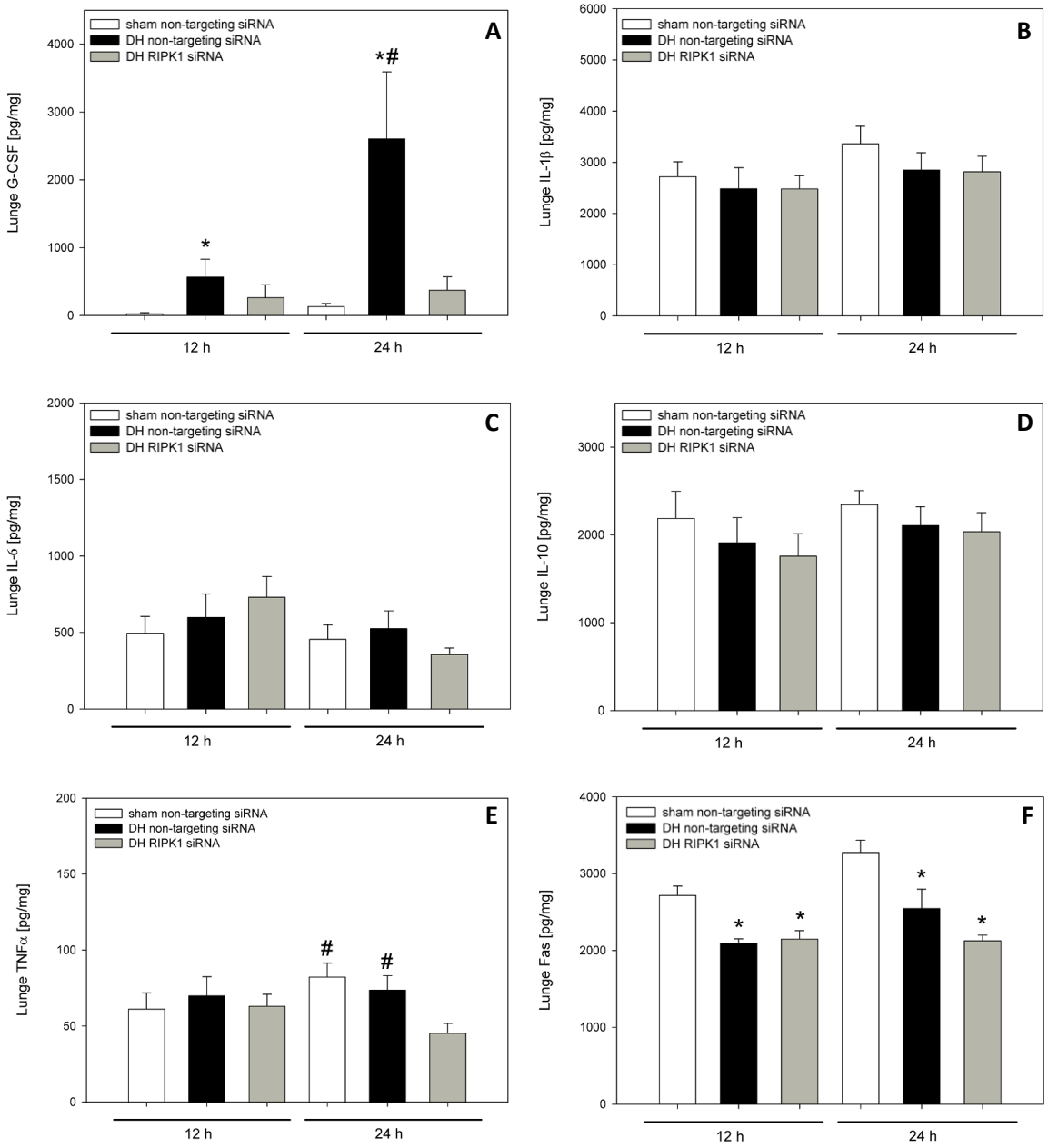
3.4 ELISA

Die Überstände von Lungenhomogenat, Plasma und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit wurden mittels ELISA Sandwich-Technik analysiert und pro- sowie antiinflammatorische Zyto- und Chemokine quantifiziert.

3.4.1 Zytokine / Chemokine im Lungenhomogenat

12 und 24 h nach Thoraxtrauma und Sepsis waren die Konzentrationen von G-CSF in der nt siRNA Gruppe signifikant erhöht gegenüber den Kontrolltieren, mit stärker erhöhten Werten zum späteren Messzeitpunkt (Abb. 8 A). Nach RIPK1 siRNA Instillation und Double-Hit war kein derartiger Anstieg zu verzeichnen. In Bezug auf IL-1β, IL-6 und IL-10 waren keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen evident (Abb. 8 B, C, D). Die Werte von TNF-α waren in der RIPK1 siRNA Gruppe lediglich nach 24 h signifikant gegenüber der Sham- und DH nt Gruppe gesenkt (Abb. 8 E). Sowohl nach 12 h als auch nach 24 h zeigten sich bei Traumatieren signifikant erniedrigte Konzentrationen an Fas-Rezeptor in den Überständen der Lungenhomogenate gegenüber den Kontrolltieren, unabhängig von der Art der verwendeten siRNA (Abb. 8 F). Eine derartige Tendenz ist auch für den Fas-Liganden nach 12 h zu erkennen, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 8 G).

Für MCP-1 wurde lediglich in der DH nt siRNA Gruppe statistische Signifikanz gegenüber den Kontrolltieren erreicht. Nach 24 h ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied gegenüber der DH RIPK1 siRNA Gruppe (Abb. 8 H). Nach Thoraxtrauma und Sepsis war KC nach 12 h in beiden Traumagruppen signifikant gegenüber den Sham Tieren erhöht (Abb. 8 I). Für MIP-2 konnten signifikant erhöhte Werte nach 24 h in der DH nt Gruppe verzeichnet werden (Abb. 8 J). Silencing von RIPK1 führte zum 24 h Zeitpunkt zu einer signifikanten Reduktion von KC in der Traumagruppe, die MIP-2 Erhöhung erreichte nicht das Signifikanzniveau im Vergleich zur Sham Gruppe (Abb. 8 I+J).


A
sham non-targeting siRNA
DH non-targeting siRNA
DH RIPK1 siRNA
Lunge G-CSF [pg/mg]
4000
3000
2000
1000
0
*
*#
12 h
24 h
B
sham non-targeting siRNA
DH non-targeting siRNA
DH RIPK1 siRNA
Lunge IL-1β [pg/mg]
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
12 h
24 h
C
sham non-targeting siRNA
DH non-targeting siRNA
DH RIPK1 siRNA
Lunge IL-6 [pg/mg]
2000
1500
1000
500
0
12 h
24 h
D
sham non-targeting siRNA
DH non-targeting siRNA
DH RIPK1 siRNA
Lunge IL-10 [pg/mg]
3000
2000
1000
0
12 h
24 h
E
sham non-targeting siRNA
DH non-targeting siRNA
DH RIPK1 siRNA
Lunge TNFα [pg/mg]
200
150
100
50
0
#
#
12 h
24 h
F
sham non-targeting siRNA
DH non-targeting siRNA
DH RIPK1 siRNA
Lunge Fas [pg/mg]
4000
3000
2000
1000
0
*
*
*
*
12 h
24 h

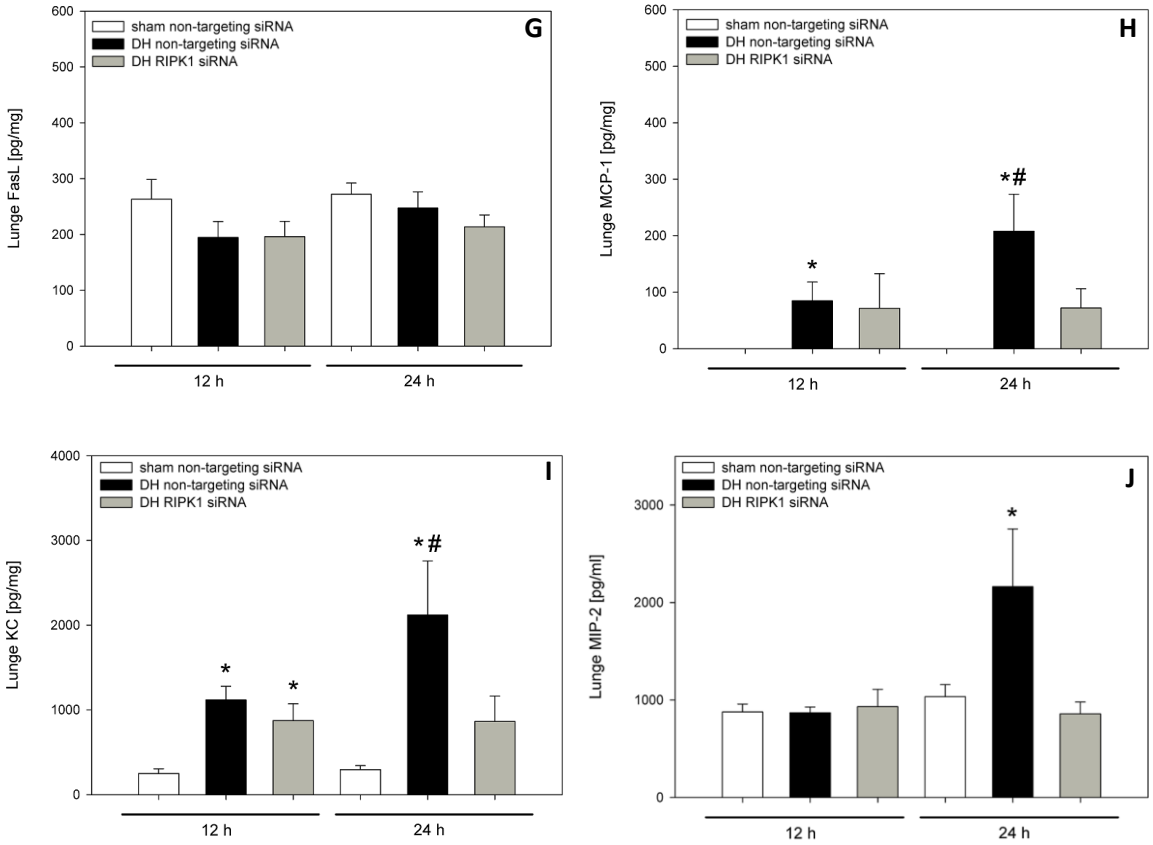
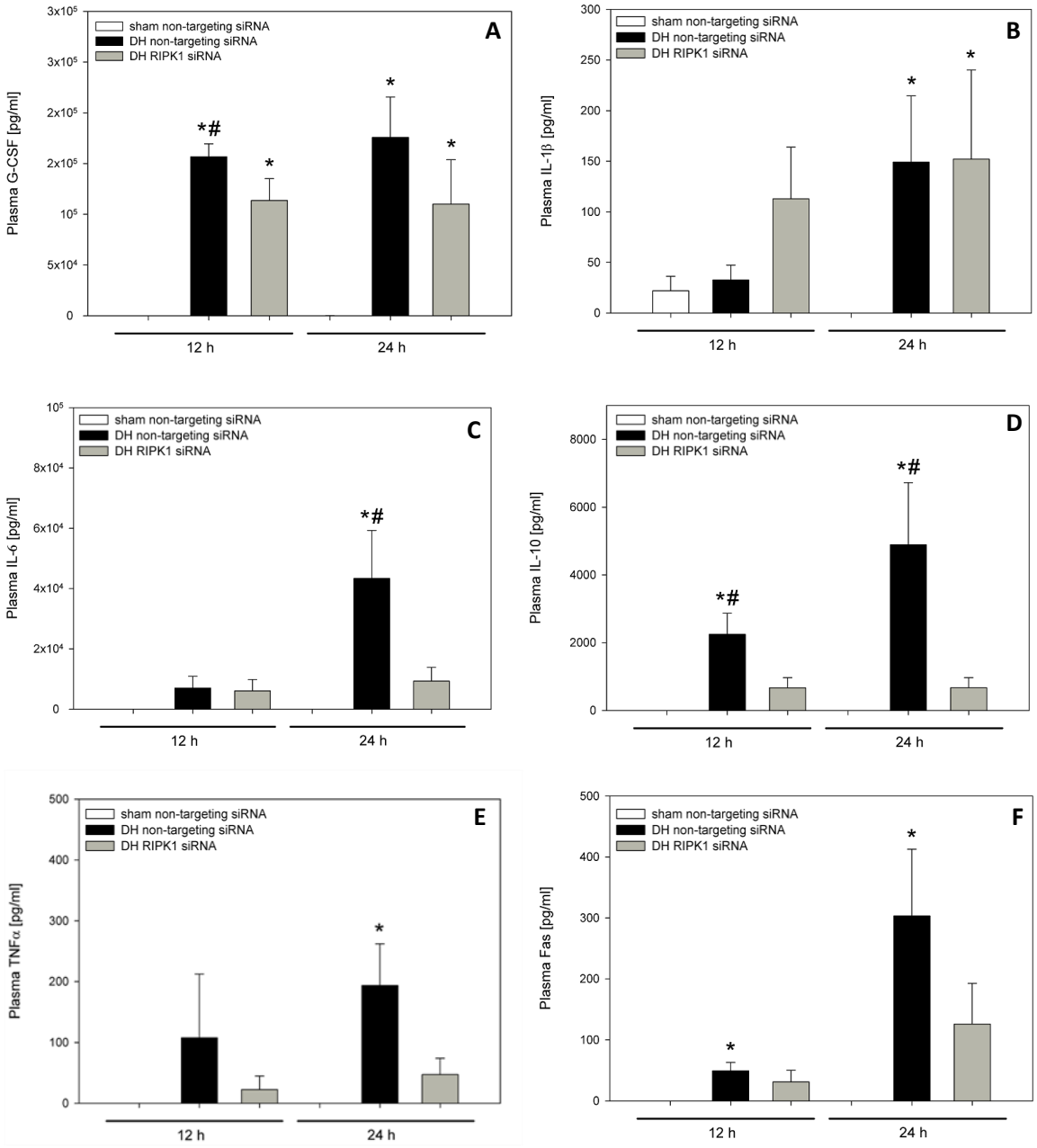


Abb. 8: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) der Lungengewebskonzentrationen von G-CSF, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, Fas, FasL, MCP-1, KC und MIP-2 12 und 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH), bzw. Kontrolleingriff (sham) (n=5-8/Gruppe). *p < 0,05 vs. korrespondierende sham non-targeting, #p < 0,05 vs. korrespondierende DH RIPK1, Kruskal-Wallis Test + Dunn's Test, Mittelwert ± Standardfehler. (Abk.: DH= Double-Hit, Fas= Synonym: Cluster of Differentiation 95/CD95, FasL= Fas-Ligand, G-CSF= Granulocyte-Colony Stimulating Factor, IL-1β/-6/-10= Interleukin-1ß/-6/-10, KC= Keratinocyte-derived Chemokine, MCP-1= Monocyte Chemotactic Protein-1, MIP2= Macrophage Inflammatory Protein-2, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid , TNF-α= Tumor Necrosis Factor-alpha).

3.4.2 Zytokine / Chemokine im Plasma

Im Plasma war die gemessene Konzentration an G-CSF nach 12 h in der DH RIPK1 siRNA Gruppe signifikant gegenüber der DH nt siRNA Gruppe erniedrigt. Beide Gruppen wiesen auch nach 24 h erhöhte Werte gegenüber den Kontrolltieren auf (Abb. 9 A). IL-1β erreichte lediglich nach 24 h in den Traumagruppen statistische Signifikanz gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 9 B). Die Konzentration von IL-6 war nach 24 h signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Silencing von RIPK1 führte zu einer signifikanten Reduktion der Plasmaspiegel von IL-6 nach 24 h (Abb. 9 C). Dies trifft auch für die gemessenen Werte von IL-10 nach 12 und 24 h zu (Abb. 9 D). TNF-α war in der DH RIPK1 siRNA Gruppe nach 24 h statistisch nicht signifikant erhöht gegenüber der sham nt siRNA Gruppe (Abb. 9 E), bei FasL war dies nach 12 h der Fall (Abb. 9 G). Fas-Rezeptor war lediglich in der DH nt siRNA Gruppe zu beiden

Zeitpunkten signifikant gegenüber den Sham Tieren erhöht (Abb. 9 F), was so auch für KC zutraf (Abb. 9 I). Das Chemokin MCP-1 war zu beiden Zeitpunkten in den RIPK1 siRNA Interventionsgruppen signifikant reduziert gegenüber den DH nt siRNA Gruppen (Abb. 9 H). Die Konzentration von MIP-2 war nach 12 h in beiden Traumagruppen signifikant erhöht, nach 24 h nur noch in der DH nt siRNA Gruppe (Abb. 9 J).



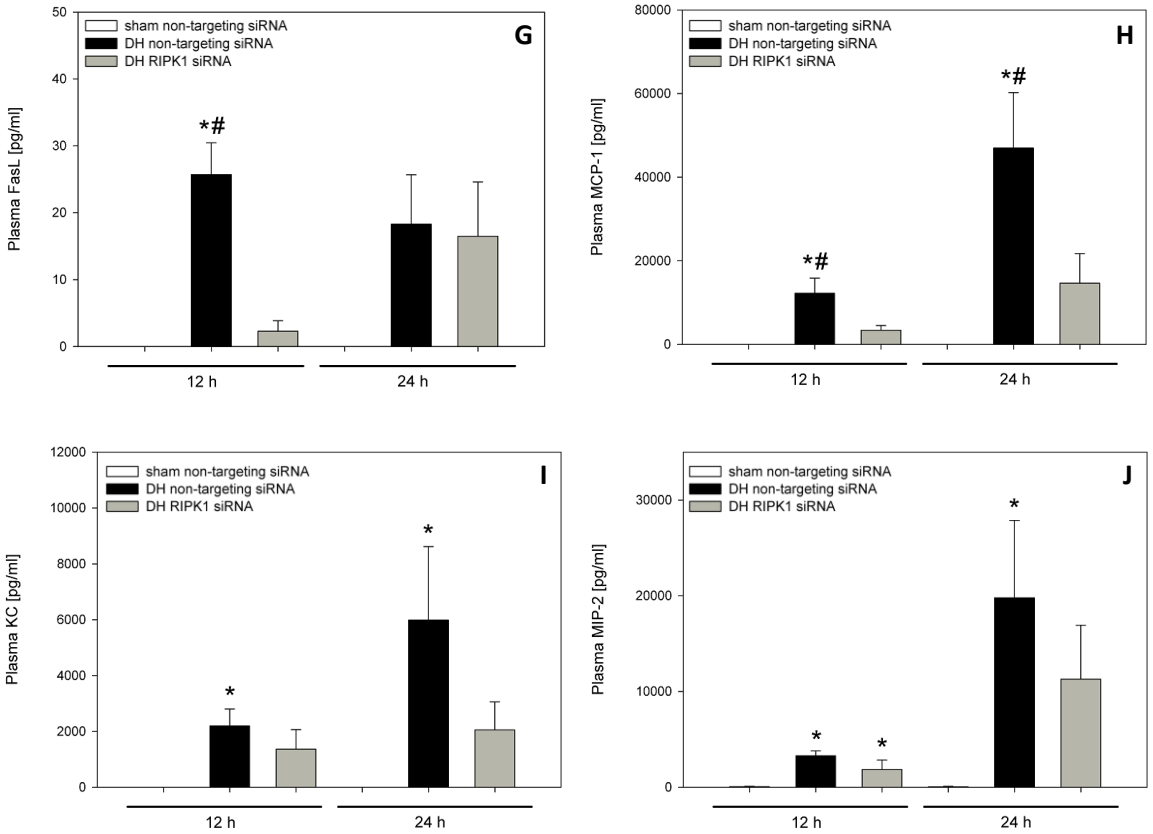
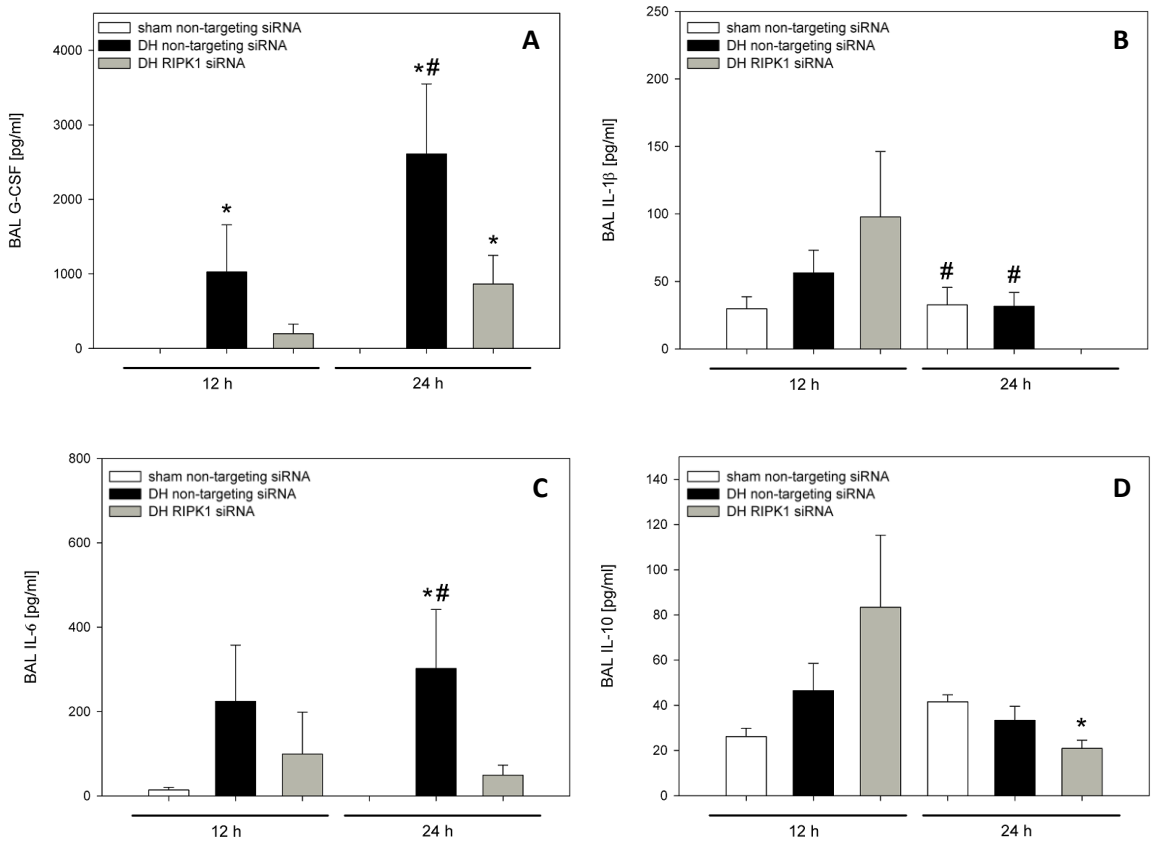


Abb. 9: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) der Blutplasmakonzentrationen von G-CSF, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, Fas, FasL, MCP-1, KC und MIP-2 12 und 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH), bzw. Kontrolleingriff (sham) (n=5-8/Gruppe). *p < 0,05 vs. korrespondierende sham non-targeting, #p < 0,05 vs. korrespondierende DH RIPK1, Kruskal-Wallis Test + Dunn's Test, Mittelwert ± Standardfehler. (Abk.: DH= Double-Hit, Fas= Synonym: Cluster of Differentiation 95/CD95, FasL= Fas-Ligand, G-CSF= Granulocyte-Colony Stimulating Factor, IL-1β/-6/-10= Interleukin-1ß/-6/-10, KC= Keratinocyte-derived Chemokine, MCP-1= Monocyte Chemotactic Protein-1, MIP2= Macrophage Inflammatory Protein-2, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid , TNF-α= Tumor Necrosis Factor-alpha).

3.4.3 Zytokine / Chemokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

G-CSF war nach 12 h lediglich in der DH nt siRNA Gruppe, nach 24 h in beiden Traumagruppen signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht, zum 24 h Zeitpunkt führte Silencing von RIPK1 zu einer signifikanten Reduktion der G-CSF Spiegel (Abb. 10 A). IL-1ß sowie IL-10 waren zu beiden Zeitpunkten in der DH nt Gruppe unverändert zur Kontrollgruppe. Lediglich nach 24 h zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der IL-1ß und IL-10 Werte gegenüber den DH nt und sham nt Gruppen in der RIPK1 siRNA Interventionsgruppe (Abb. 10 B+D). Silencing von RIPK1 vermochte nach 24 h die IL-6 Spiegel in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit signifikant gegenüber der DH nt Gruppe zu senken. TNF-α war lediglich nach 24 h in der DH nt Gruppe signifikant gegenüber der sham Kontrolle erhöht, wobei RIPK1 siRNA zu einer signifikanten Reduktion der TNF-α Werte führte (Abb. 10 E). Die Erhöhung von Fas-Rezeptor erreichte

nach 24 h statistische Signifikanz in der DH nt Gruppe, wobei auch hier wiederum die Applikation von RIPK1 siRNA die Fas-Rezeptor Konzentrationen signifikant zu senken vermochte (Abb. 10 F). Gleiches gilt für den Fas-Liganden (Abb. 10 G). Lediglich die DH nt Traumagruppe wies signifikant höhere Werte an MCP-1 gegenüber den Kontrolltieren zum 24 h Zeitpunkt auf, in der RIPK1 siRNA Gruppe blieben die MCP-1 Werte zu beiden Zeitpunkten auf Sham-Niveau (Abb. 10 H). Die Erhöhung von KC und MIP-2 in der BAL nach Trauma und Sepsis erreichte nach 24 h Signifikanz in der nt siRNA Gruppe gegenüber den Kontrolltieren. Silencing von RIPK1 führte zu einer signifikanten Reduktion der KC und MIP-2 Konzentrationen nach 24 h (Abb. 10 I+J).



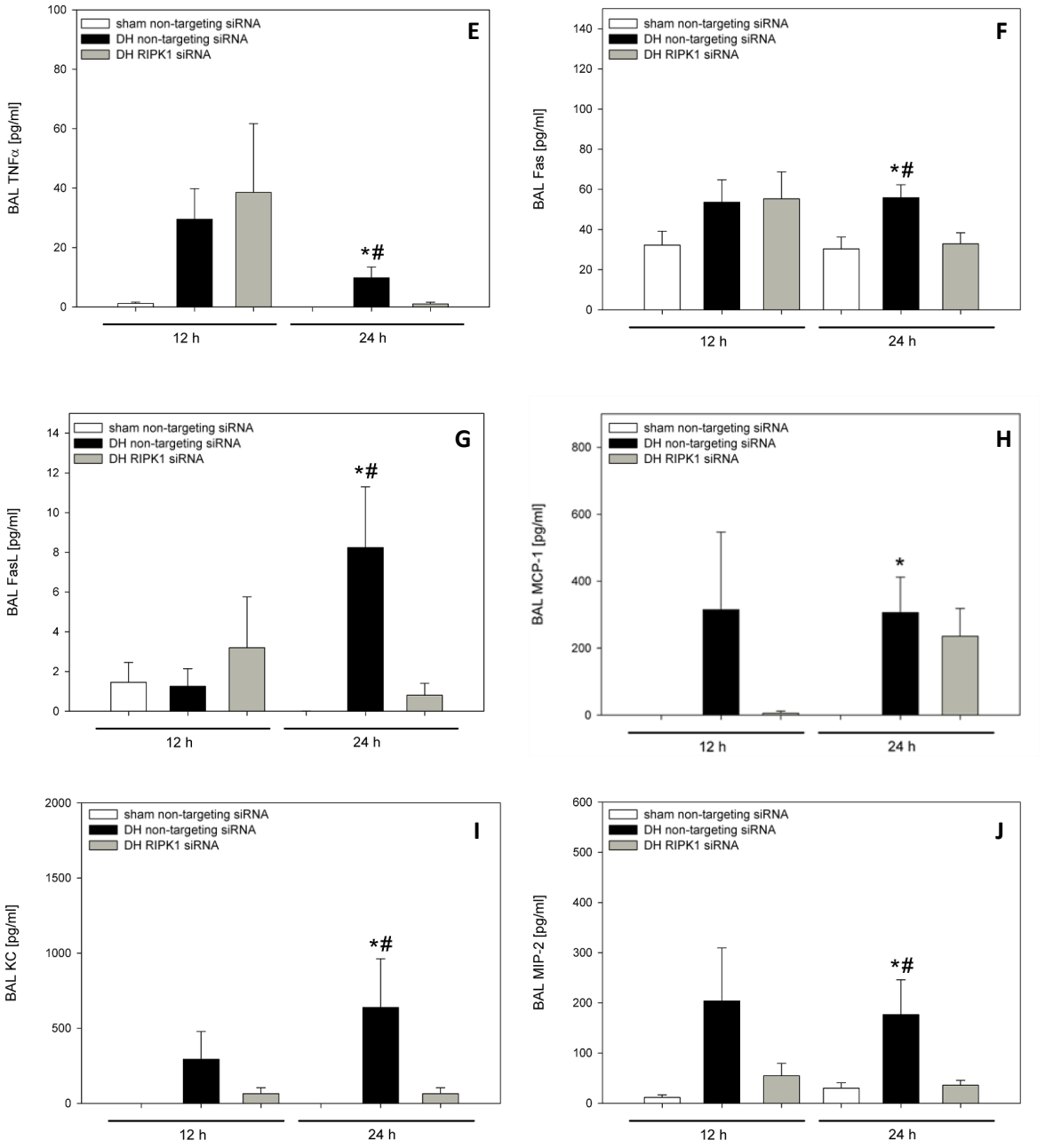


Abb. 10: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) der Konzentrationen von G-CSF, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, Fas, FasL, MCP-1, KC und MIP-2 in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BAL) 12 und 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH), bzw. Kontrolleingriff (sham) (n=5-8/Gruppe). *p < 0,05 vs. korrespondierende sham non-targeting, #p < 0,05 vs. korrespondierende DH RIPK1, Kruskal-Wallis Test + Dunn's Test, Mittelwert ± Standardfehler. (Abk.: DH= Double-Hit, Fas= Synonym: Cluster of Differentiation 95/CD95, FasL= Fas-Ligand, G-CSF= Granulocyte-Colony Stimulating Factor, IL-1β/-6/-10= Interleukin-1ß/-6/-10, KC= Keratinocyte-derived Chemokine, MCP-1= Monocyte Chemotactic Protein-1, MIP2= Macrophage Inflammatory Protein-2, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid , TNF-α= Tumor Necrosis Factor-alpha).

3.5 Myeloperoxidaseaktivität

Zur Bestimmung des Influx neutrophiler Granulozyten in das gesamte Kompartiment der Lunge wurde die Aktivität des Hämoproteins Myeloperoxidase in einem homogenisierten Teilstück des rechten Lungenmittellappens bestimmt.

Sowohl 12 als auch 24 h nach Thoraxtrauma und Sepsis zeigten sich erhöhte Werte der MPO-Aktivität, die jedoch in keiner Interventionsgruppe statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe waren (Abb. 11).

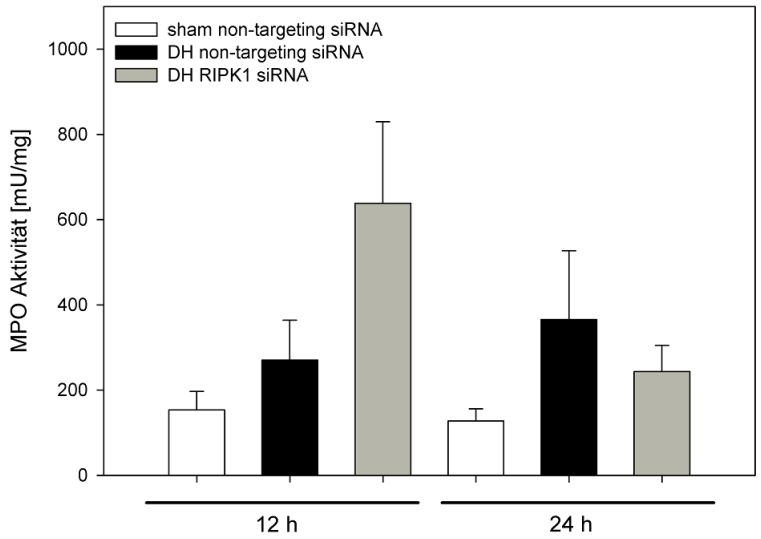


Abb. 11: Myeloperoxidase(MPO-)aktivität 12 und 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH), bzw. Kontrolleingriff (sham) in mU/mg (n=5-8/Gruppe). Kruskal-Wallis Test, Mittelwert ± Standardfehler. (Abk.: DH= Double-Hit, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid).

3.6 Zellzählung und -differenzierung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Im Zuge des Entzündungsprozesses nach Thoraxtrauma und Sepsis kommt es zur Akkumulation von Zellen und deren Fragmente. Insbesondere den neutrophilen Granulozyten wird hierbei eine Rolle bei der Aggravation der lokalen und systemischen Inflammation sowie der Lungenschädigung selbst zugeschrieben.

Die relative undifferenzierte Zellzahl pro ml BAL-Flüssigkeit stieg erst nach 24 h signifikant in den Traumagruppen gegenüber den Kontrolltieren, ohne Einfluss der Art der verwendeten siRNA (Abb. 12).

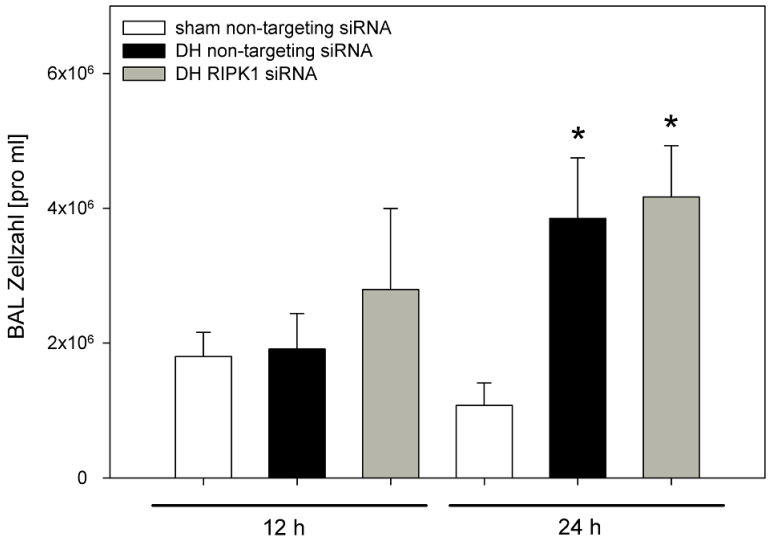


Abb. 12: Zellzahl pro Milliliter (ml) BAL (Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit) 12 und 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH), bzw. Kontrolleingriff (sham) (n= 5-8/Gruppe). *p < 0,05 vs. sham non-targeting 24 h, one-way ANOVA (Analysis of Variance) + Student-Newman-Keuls Test, Mittelwert ± Standardfehler. (Abk.: DH= Double-Hit, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid).

Nach Zelldifferenzierung und erneuter Auszählung zeigte sich eine signifikant erhöhte Zahl an neutrophilen Granulozyten als prozentualer Anteil aller Zellen pro ml BAL-Flüssigkeit in beiden Traumagruppen gegenüber den Kontrolltieren. Den prozentual größten Anteil stellten in allen Traumagruppen Alveolarmakrophagen dar. Tendenziell erhöhte Werte neutrophiler Granulozyten wurden nach 12 h in der DH nt siRNA Gruppe gegenüber der RIPK1 siRNA Gruppe erreicht, welche jedoch keine statistische Signifikanz erreichten (Abb. 13).

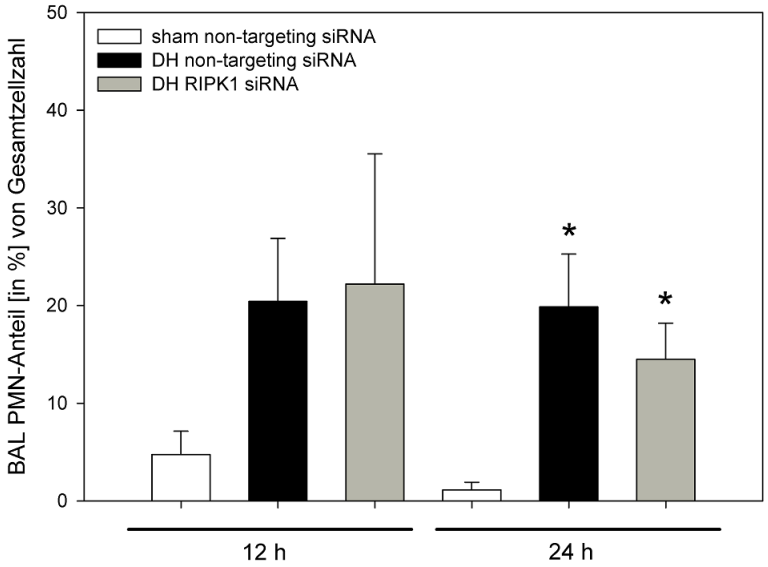


Abb. 13: Relative Zahl der neutrophilen Granulozyten (Synonym: PMN= Polymorphonuclear Leucocytes) der BAL-Flüssigkeit 12 und 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH), bzw. Kontrolleingriff (sham) (n= 5-8/Gruppe). *p < 0,05 vs. sham non-targeting 24 h, one-way ANOVA (Analysis of Variance) + Student-Newman-Keuls Test, Mittelwert ± Standardfehler. (Abk.: DH= Double-Hit, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid).

3.7 Western Blotting von Caspase-3 im Lungenhomogenat

Ergänzend zu der quantitativen Auswertung der TUNEL-Färbungen (s. 3.8) wurden Western Blots des aktiven Fragmentes der Caspase-3 aus den Überständen der Lungenhomogenate erstellt. Trotz tendenziell höherer Werte aktiver Caspase-3 zum 12 und 24 h Zeitpunkt in den Traumagruppen (Abb. 14) erreichten diese Unterschiede nach quantitativer densitometrischer Analyse zu keinem Zeitpunkt statistische Signifikanz (Daten nicht gezeigt).

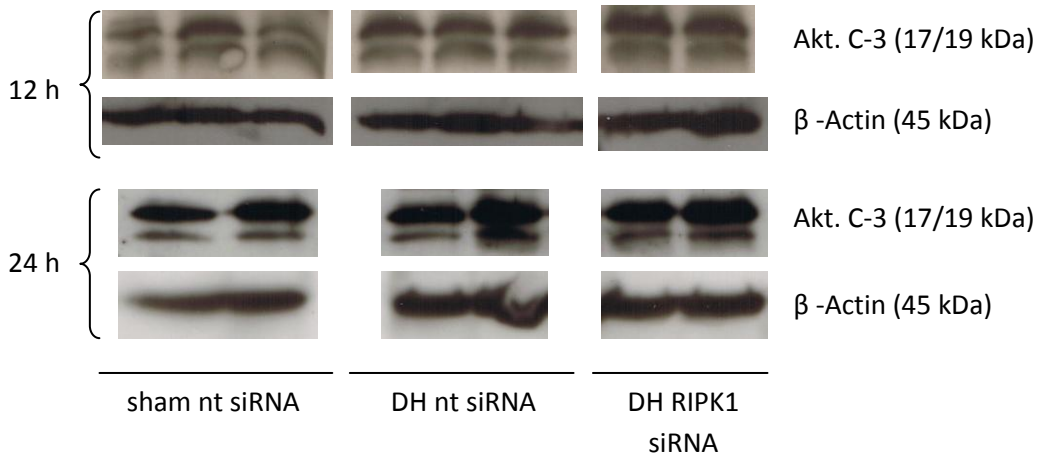


Abb. 14: Repräsentative Western Blot Analyse der Menge aktiver Caspase-3 (akt. C-3, 17/19 kDa) im Lungenhomogenat der Versuchsgruppen (unbehandelte sham non-targeting (sham nt), Double-Hit non-targeting (DH nt) und Double-Hit RIPK1 (DH RIPK1) siRNA) nach 12 und 24 Stunden (h). Zur Normalisierung dient der korrespondierende β-Actin Re-Blot (45 kDa). (Abk.: RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid).

3.8 TUNEL-Färbung von Lungengewebsschnitten

Zur Charakterisierung des Einflusses von Thoraxtrauma und Sepsis sowie des *in vivo* Knockdowns von RIPK1 in Lungenepithelzellen wurden paraffinfixierte Lungengewebsschnitte von Trauma- und Kontrolltieren nach der TUNEL-Methode gefärbt. Hierbei werden (teil-)fragmentierte DNA-Stränge als Zeichen der sich in Gange befindlichen Apoptose mittels Immunfluoreszenztechnik sichtbar gemacht (Abb. 15).

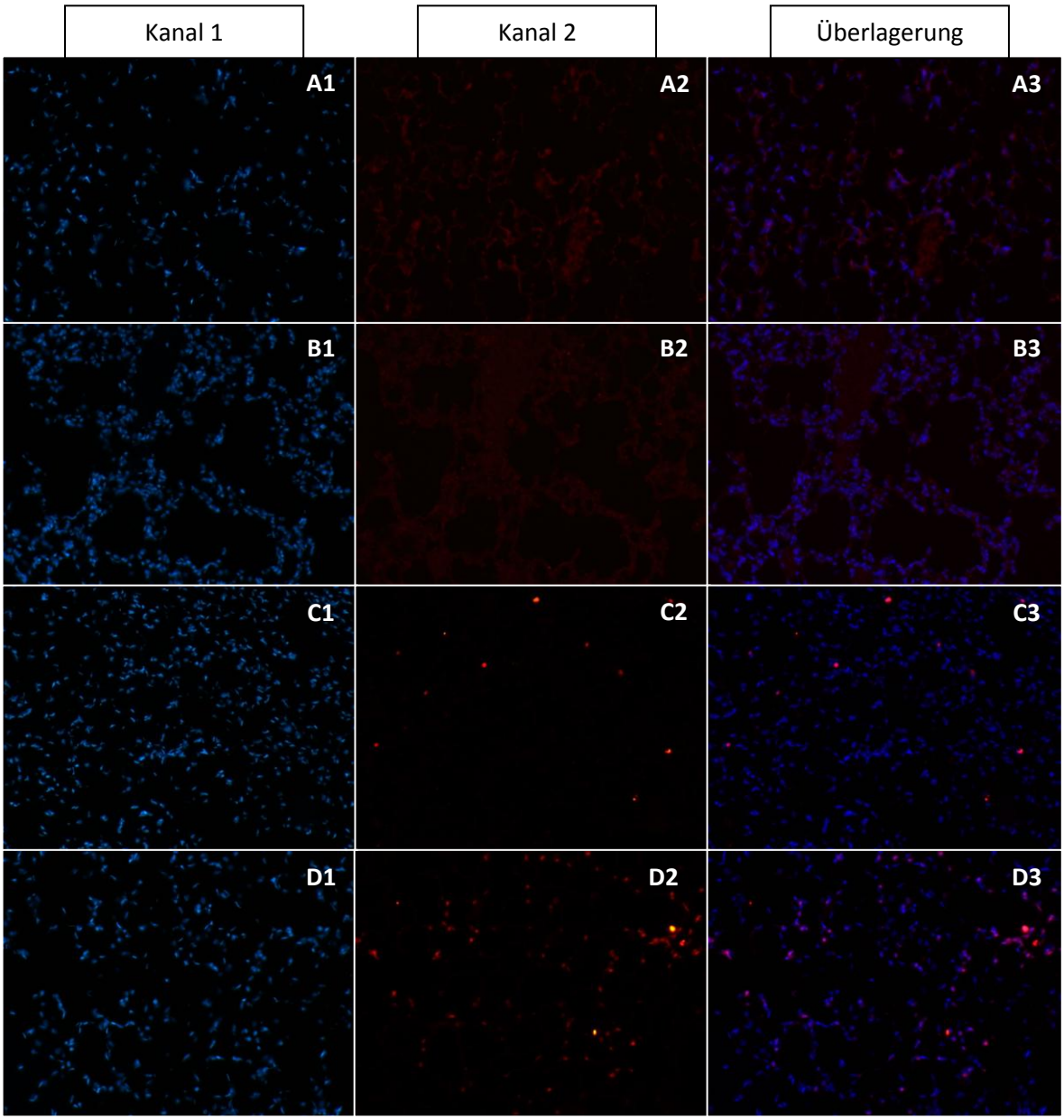


Abb. 15: Repräsentative TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Färbungen paraffinfixierter Lungengewebsschnitte von Negativkontrollen (A1-3), Kontrolltieren (sham non-targeting siRNA, B1-3), Double-Hit non-targeting (DH nt) siRNA (C1-3), sowie Double-Hit RIPK1 (DH RIPK1) siRNA (D1-3) behandelter Versuchstiere zum 12 Stunden (h) Zeitpunkt. Bisbenzimidkernfärbung (blau, Kanal-1), TUNEL-Färbung (rot, Kanal-2) sowie die Überlagerung beider Kanäle. 200-fache Vergrößerung. (Abk.: RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid).

Sowohl nach 12 als auch 24 h war die Zahl der TUNEL-positiven Zellen in den Traumagruppen signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Zwischen den DH nt und den DH RIPK1 siRNA Gruppen waren keine statistisch signifikanten Unterschiede evident (Abb. 16).

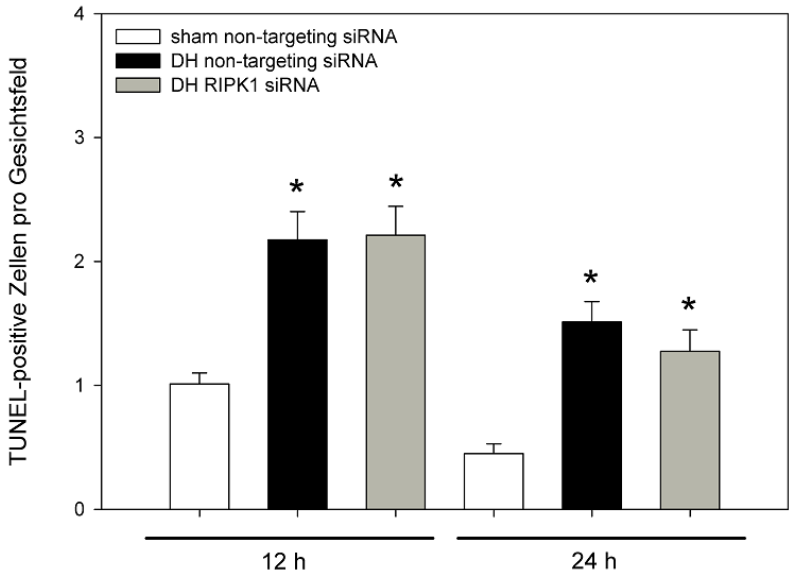


Abb. 16: Auswertung der TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Färbungen paraffinfixierter Lungengewebsschnitte 12 und 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH), bzw. Kontrolleingriff (sham). TUNEL-positive Zellen wurden in jeweils 10 Gesichtsfeldern pro Präparat bei 200-facher Vergrößerung gezählt (n= 4 /Gruppe). *p < 0,05 vs. korrespondierende Kontrollgruppe (sham), Kruskal-Wallis Test + Dunn's Test, Mittelwert ± Standardfehler. (Abk.: DH= Double-Hit, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid).

3.9 Bestimmung der alveolokapillären Leckage und der Lungenschädigung

Der Gesamtproteingehalt der BAL-Flüssigkeit korreliert mit der Durchlässigkeit der alveolokapillären Barriere, welche im Zuge der akuten Lungenschädigung zunehmend kompromittiert wird.

24 h nach Double-Hit war der Proteingehalt der BAL-Flüssigkeit signifikant in beiden Traumagruppen gegenüber den Kontrolltieren erhöht, nach 12 h jedoch nur in der Gruppe der non-targeting siRNA behandelten Versuchstiere. Zwischen der non-targeting und der RIPK1 siRNA Gruppe bestand nach Thoraxtrauma und Sepsis kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 17).

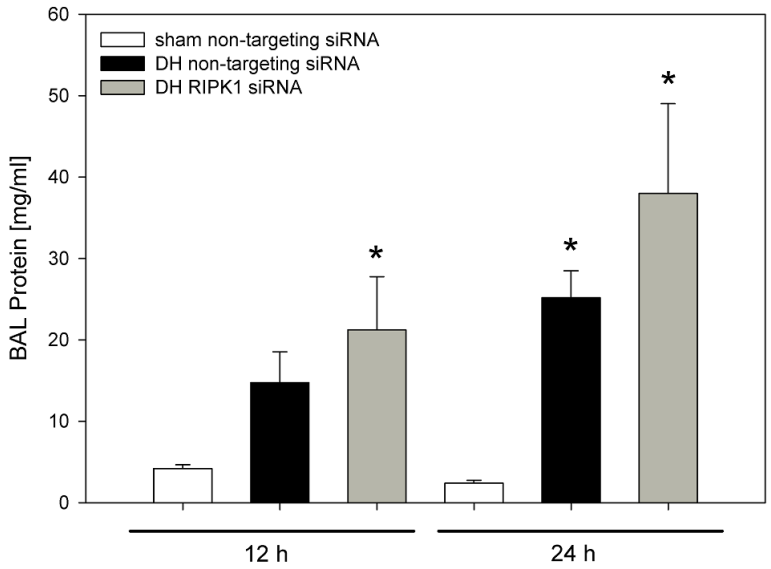


Abb. 17: BAL (Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit) Proteingehalt 12 und 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH), bzw. Kontrolleingriff (sham). *p < 0,05 vs. korrespondierende Kontrollgruppe (sham), Kruskal-Wallis Test + Dunn's Test, Mittelwert ± Standardfehler. (Abk.: DH= Double-Hit, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid).

In Hämatoxylin/Eosin gefärbten histologischen Schnitten waren in den Traumagruppen zu beiden Zeitpunkten deutliche Zeichen der akuten Lungenschädigung zu erkennen. Insbesondere Charakteristika wie alveoläre Einblutungen, Verdickung alveolärer Wände als auch die Bildung hyaliner Membranen als Zeichen der Zerstörung der alveolokapillären Barriere unterschieden sich nicht in der DH nt und DH RIPK1 siRNA Gruppe (Abb. 18).

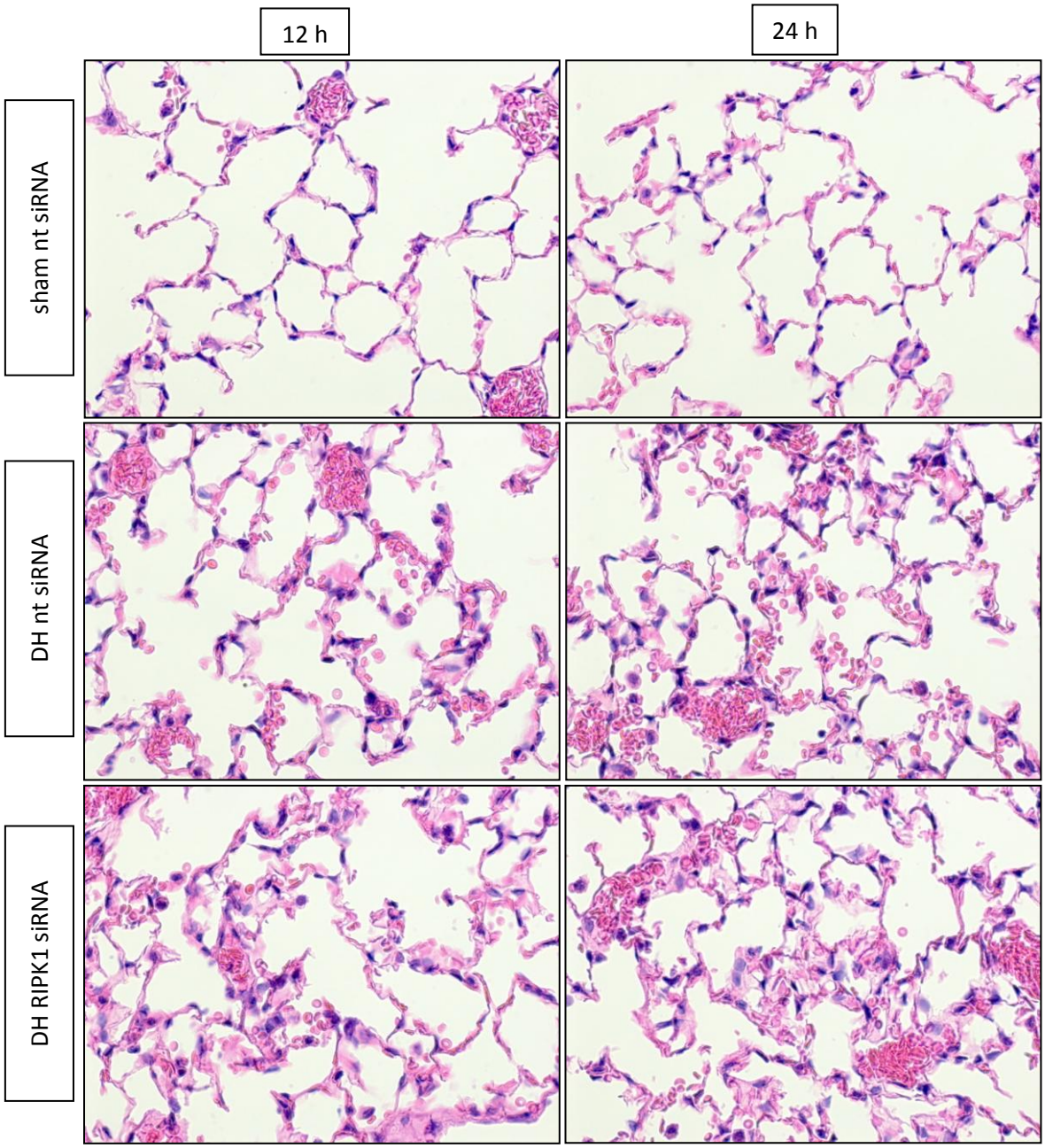


Abb. 18: Hämatoxylin/Eosin gefärbte Lungengewebsschnitte von Kontrolltieren (sham non-targeting (nt) siRNA), Double-Hit non-targeting (DH nt) siRNA sowie Double-Hit RIPK1 (DH RIPK1) siRNA behandelter Versuchstiere zum 12 und 24 Stunden (h) Zeitpunkt. 400-fache Vergrößerung. (Abk.: DH= Double-Hit, nt= non-targeting, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid).

3.10 Mechanistische Studie im Zellmodell

3.10.1 Koinkubation TNF-α stimulierter Zellen mit zVAD-fmk und Necrostatin-1

Zur weiteren Differenzierung der Signaltransduktion aus dem tierexperimentellen Teil wurden zunächst MLE12, MHS oder L929 Zellen mit TNF-α inkubiert und die Auswirkungen einer Apoptoseinhibition mittels zVAD-fmk sowie Necroptoseinhibition mittels Necrostatin-1 untersucht.

In MLE12 Zellen bewirkte eine Inkubation mit TNF-α eine deutliche Reduktion der Vitalität zu den gemessenen Zeitpunkten nach 12, 24 und 48 h. Während Necrostatin-1 keinen Einfluss auf die Überlebensrate hatte, bewirkte eine Vorinkubation mit zVAD-fmk eine Reduktion der TNF-α induzierten Zelltodrate (Abb. 19.).

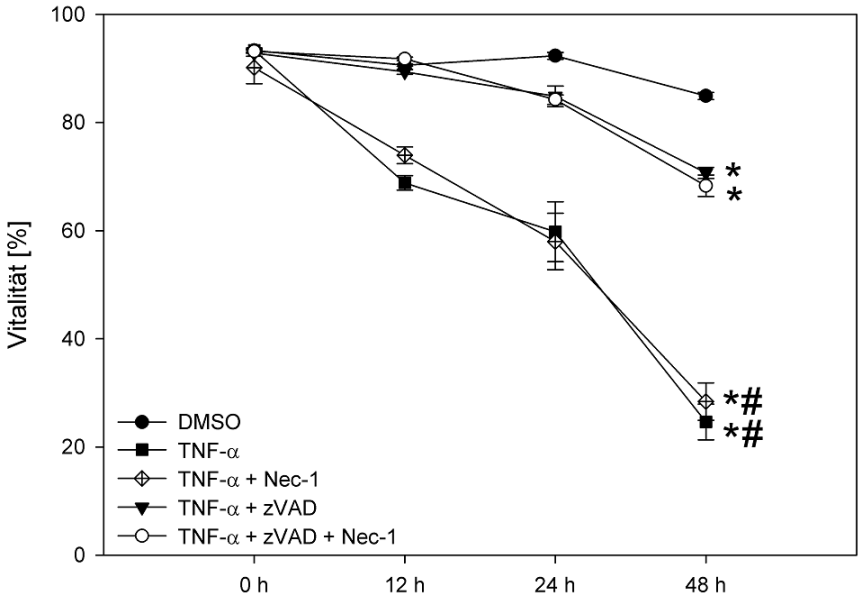


Abb. 19: Vitalität nach Koinkubation von MLE12 (Murine Lung Epithelial Cells 12) Zellen mit TNF-α (Tumor Necrosis Factor-alpha) und den Inhibitoren zVAD (Synonym: zVAD-fmk= Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketon) und Necrostatin-1 (Nec-1) sowie deren Lösungsmittelkontrolle DMSO (Dimethylsulfoxid). Darstellung als prozentualer Anteil der noch lebenden Zellen zum 0, 12, 24 und 48 Stunden (h) Zeitpunkt (n=3-4 /Gruppe). FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)-Analyse nach AnnexinV/ 7-AAD(7-Aminoactinomycin)-Färbung. * $p < 0,05$ vs. DMSO, # $p < 0,05$ vs. TNF-α+zVAD/TNF-α+zVAD+Nec-1, one-way ANOVA (Analysis of Variance), Mittelwert ± Standardfehler.

In L929 Zellen führte eine Inkubation mit zVAD-fmk zu einem beschleunigten Absterben der Zellen bei Koinkubation mit TNF-α im Vergleich zur alleinigen TNF-α Behandlung. Dieser TNF-α induzierte Zelltod erwies sich als inhibierbar durch den spezifischen Necroptoseinhibitor Necrostatin-1. Selbst bei Koinkubation von L929 Zellen mit TNF-α, zVAD-fmk und Necrostatin-1 konnte die Zelltodrate durch Necrostatin-1 immer noch signifikant gesenkt werden (Abb. 20).

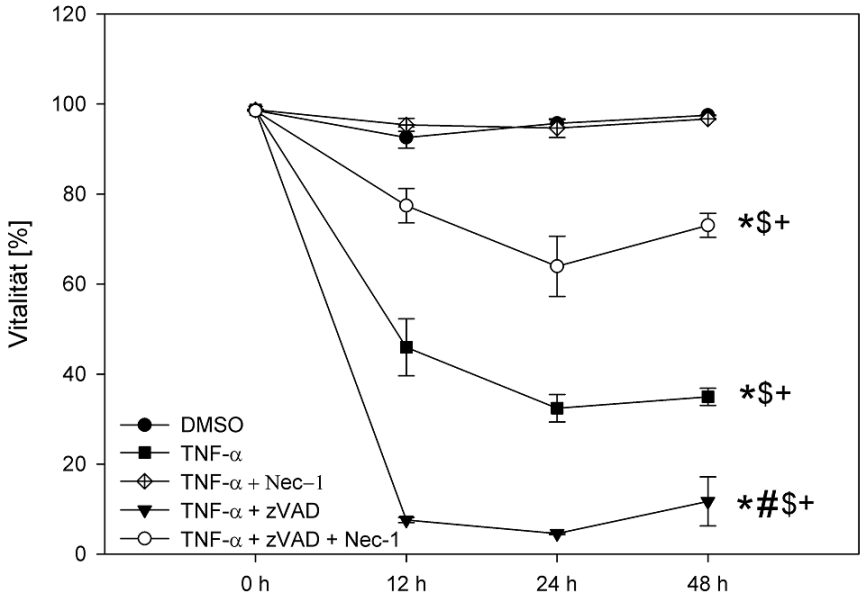


Abb. 20: Vitalität nach Koinkubation von L929 (Murine Fibroblastenzelllinie, Stamm „L“) Zellen mit TNF-α (Tumor Necrosis Factor-alpha) und den Inhibitoren zVAD (Synonym: zVAD-fmk= Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketon) und Necrostatin-1 (Nec-1) sowie deren Lösungsmittelkontrolle DMSO (Dimethylsulfoxid). Darstellung als prozentualer Anteil der noch lebenden Zellen zum 0, 12, 24 und 48 Stunden (h) Zeitpunkt (n=3-4 /Gruppe). FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)-Analyse nach AnnexinV/ 7-AAD(7-Aminoactinomycin)-Färbung. * $p < 0,05$ vs. DMSO, # $p < 0,05$ vs. TNF-α+Nec-1, $ $p < 0,05$ vs. TNF-α+zVAD+Nec-1, + $p < 0,05$ vs. TNF-α, § $p < 0,05$ vs. TNF-α +zVAD, one-way ANOVA (Analysis of Variance), Mittelwert ± Standardfehler.

In MHS Zellen zeigte sich einerseits eine geringere Vitalität in den Kontrollgruppen verglichen mit MLE12 und L929 Zellen, andererseits auch eine höhere Schwankungsbreite der Zelltodraten innerhalb der einzelnen Gruppen zu den gegebenen Zeitpunkten. Lediglich nach 48 h konnte eine signifikant erniedrigte Vitalität in den TNF-α und TNF-α + Necrostatin-1 behandelten Zellen im Vergleich zu TNF-α + zVAD-fmk koinkubierten Zellen festgestellt werden (Abb. 21).

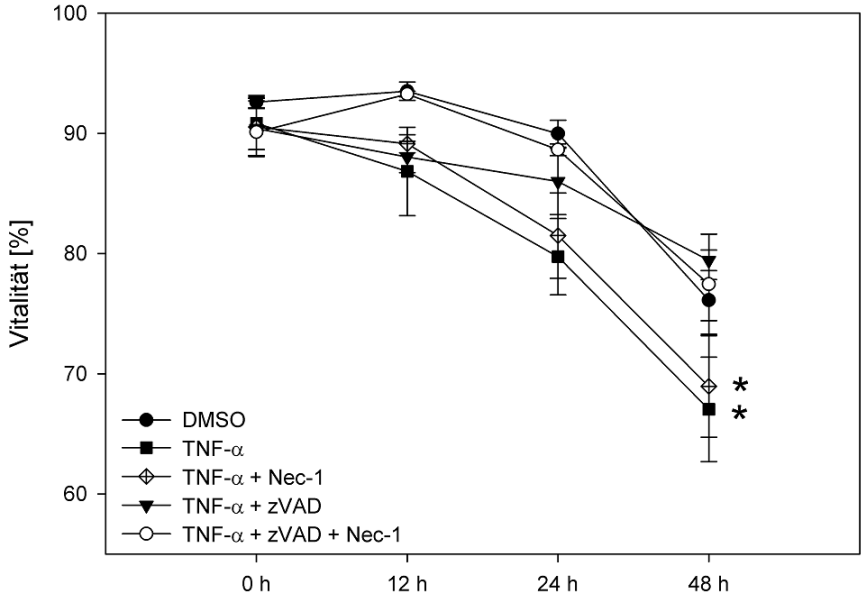


Abb. 21: Vitalität nach Koinkubation von MHS (murine Alveolarmakrophagenzelllinie) Zellen mit TNF-α (Tumor Necrosis Factor-alpha) und den Inhibitoren zVAD (Synonym: zVAD-fmk= Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketon) und Necrostatin-1 (Nec-1) sowie deren Lösungsmittelkontrolle DMSO (Dimethylsulfoxid). Darstellung als prozentualer Anteil der noch lebenden Zellen zum 0, 12, 24 und 48 Stunden (h) Zeitpunkt (n=3-4 /Gruppe). FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)-Analyse nach AnnexinV/ 7-AAD(7-Aminoactinomycin)-Färbung. * $p < 0,05$ vs. TNF-α+zVAD, t-Test, Mittelwert ± Standardfehler.

3.10.2 Jo-2 und TNF-α Stimulation von RIPK1 siRNA behandelten Zellen

Nach Inkubation von nicht transfizierten MLE12 Zellen mit TNF-α war eine messbare Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität nur in der Konzentration von 100 ng/ml nach 12 h zu verzeichnen (Abb. 22 A+B). Die nt siRNA und RIPK1 siRNA Transfektion der Zellen mittels Elektroporation führte zu den 6 h Zeitpunkten und nach 12 h in der Gruppe der geringen TNF-α Konzentration zu einer signifikant höheren Caspaseaktivität im Vergleich zu den Gruppen der nicht transfizierten Zellen. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede in der Caspase-3/7-Aktivität zwischen der non-targeting und der RIPK1 siRNA Gruppe. Gleiches gilt für die mit Jo-2 inkubierten MHS Zellen und deren Kontrollen (Abb. 22 C+D). Jedoch ließen sich in beiden Zellreihen erhöhte Mittelwerte der Caspase-3/7-Aktivität zu beiden

Zeitpunkten und beiden Konzentrationen beim Vergleich der RIPK1 mit den non-targeting siRNA behandelten Zellen feststellen, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

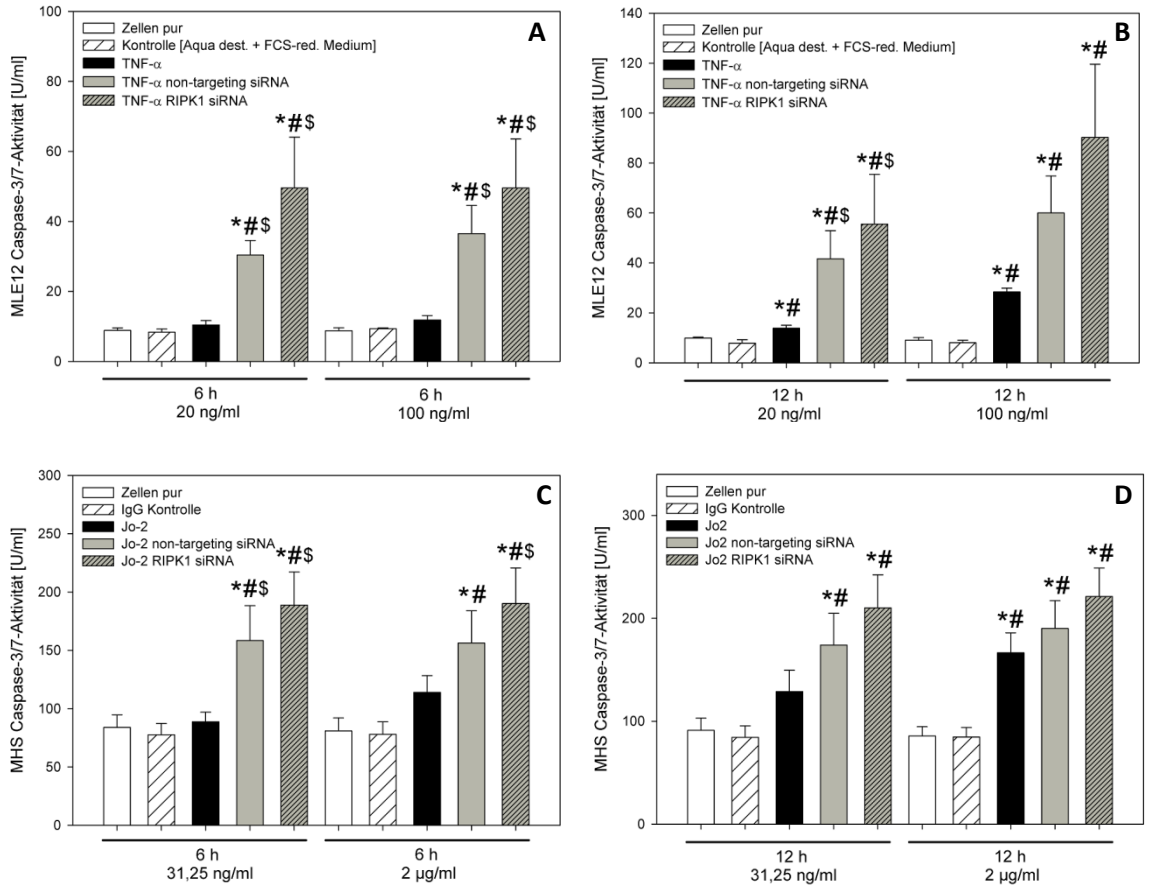


Abb. 22: Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität in MLE12 (Murine Lung Epithelial Cells 12) Zellen (A+B) und MHS (murine Alveolarmakrophagenzelllinie) Zellen (C+D) mittels Chemilumineszenz 6 und 12 Stunden (h) nach TNF-α- (MLE12, A+B) oder Jo-2- (MHS, C+D) Stimulation. (n=5/Gruppe bei MLE12, n=8/Gruppe bei MHS). * $p < 0,05$ vs. Zellen pur, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Aqua destillata + FCS-reduziertes Medium bei MLE12 Zellen; IgG bei MHS Zellen), \$ $p < 0,05$ vs. TNF-α/Jo-2, Kruskal-Wallis Test + Student-Newman-Keuls Test, Mittelwert ± Standardfehler. (Abk.: IgG= Immunglobulin G, Jo2= anti-Fas (Cluster of Differentiation 95)-Antikörper, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid, TNF-α= Tumor Necrosis Factor-alpha).

In der Messung der Zytokine im Überstand der MLE12 Zellen nach 6 bzw. 12-stündiger Inkubation mit TNF-α zeigte sich eine Erhöhung von KC und MCP-1 zu beiden Zeitpunkten und Konzentrationen im Vergleich zur DMSO Kontrollgruppe und den unbehandelten Zellen (Abb. 23 A-D). Zwischen den non-targeting siRNA und RIPK1 siRNA behandelten Zellen konnte kein Unterschied festgestellt werden. MIP-2 zeigte zu den gegebenen Zeitpunkten keine Erhöhung, weder als

Folge der TNF-α Inkubation noch als Folge der Transfektionsprozedur (Abb. 23 E+F).

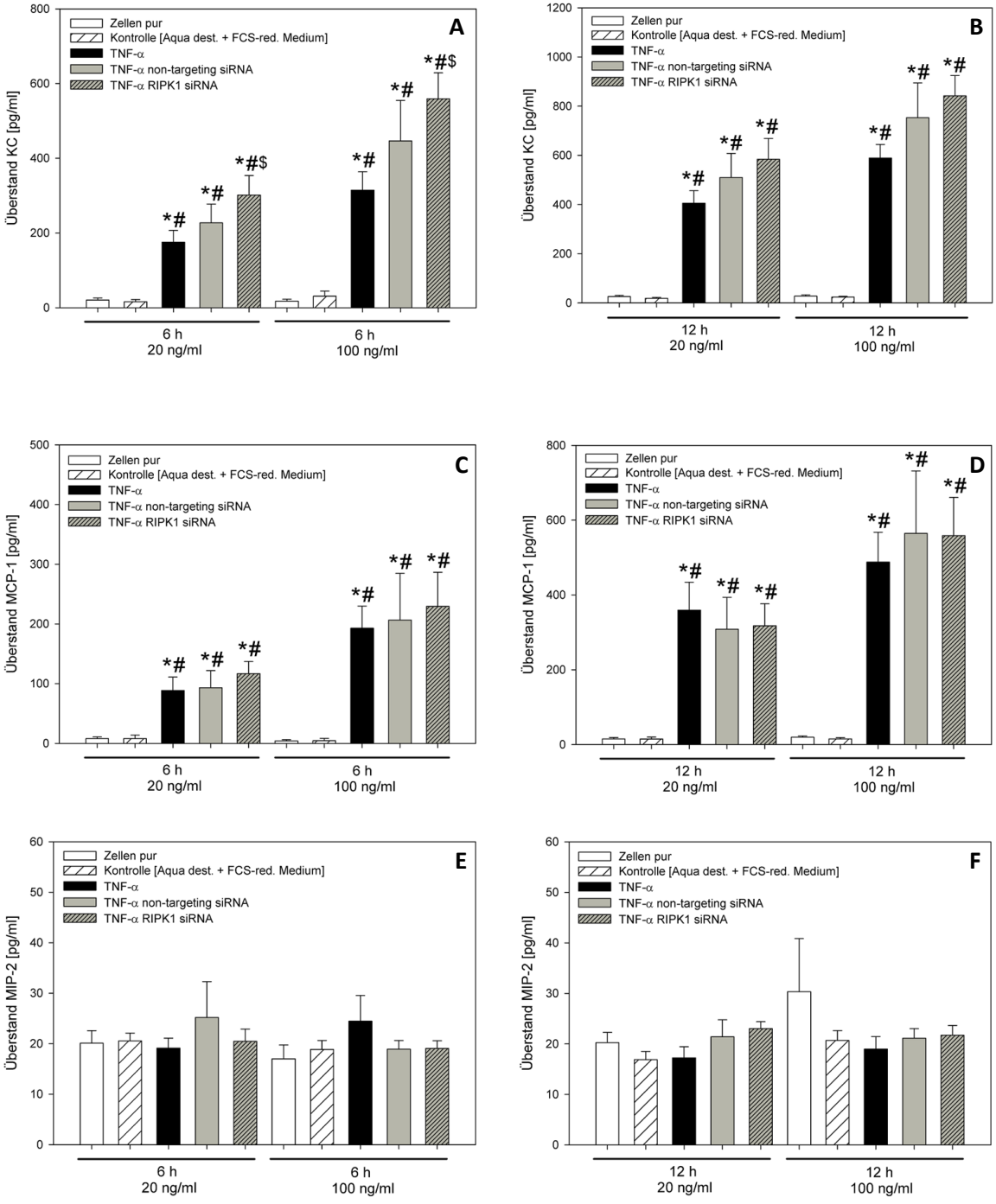


Abb. 23: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) der Zytokine KC, MCP-1 und MIP-2 6 und 12 Stunden (h) nach TNF-α Stimulation im Überstand von MLE12 (Murine Lung Epithelial Cells 12) Zellen (n=5/Gruppe). *p < 0,05 vs. Zellen pur, # p < 0,05 vs. Kontrolle (Aqua destillata + FCS-reduziertes Medium), $ p < 0,05 vs. TNF-α, one-way ANOVA (Analysis of Variance) + Student-Newman-Keuls Test, Mittelwert ± Standardfehler. (Abk.: FCS= Fetal Calf Serum, KC= Keratinocyte-derived Chemokine, MCP-1= Monocyte Chemotactic Protein-1, MIP-2= Macrophage Inflammatory Protein-2, RIPK1= Receptor Interacting Protein Kinase 1, siRNA= small interfering Ribonucleic Acid, TNF-α= Tumor Necrosis Factor-alpha).

4. Diskussion

4.1 RIPK1 Knockdown auf zellulärer Ebene und im Tiermodell

Zur Etablierung der siRNA-Interferenz wurden MLE12 Zellen mit RIPK1 siRNA mittels Elektroporation transfiziert und der Gehalt an mRNA quantifiziert sowie das Zielprotein visualisiert.

Hierbei zeigte sich, dass das Maximum des RIPK1-mRNA Knockdowns zum 12 h Zeitpunkt erreicht ist, mit rückläufigem Silencingeffekt zu den späteren Zeitpunkten. Begleitet war die Reduktion des mRNA-Gehaltes nach 12 h von einer signifikanten Reduktion des Zielproteins zum gegebenen Zeitpunkt, was für eine kurze Halbwertszeit des Proteins in der Zelllinie spricht. Es zeigte sich eine zeitliche Latenz: Nach 36 h war das zelluläre RIPK1 Zielprotein im Immunoblot kaum mehr detektierbar, während sich der mRNA-Gehalt bereits erholt hatte. Erklärbar wird dies mit der Latenzzeit zwischen mRNA-Transkription und –Translation in Verbindung mit einer kurzen Proteinhalbwertszeit von RIPK1 [124].

Bei der Analyse der siRNA-Effekte im Tiermodell war 12 h nach CLP ein reduzierter RIPK1-mRNA-Gehalt im Lungenhomogenat messbar. Dieser Wert spiegelt die Reduktion der RIPK1-mRNA im gesamten Lungengewebe wieder; über die Reduktion der mRNA in den durch die siRNA adressierten Alveolarepithelzellen kann keine Aussage getroffen werden. Es ist davon auszugehen, dass die Reduktion im Alveolarzell-mRNA-Gehalt durch die Überlagerung der nicht adressierten Ziel-mRNAs in Lungenendothel- und Bindegewebszellen noch deutlich stärker ausgeprägt ist. Das tatsächliche Ausmaß des Silencings auf mRNA-Ebene wird durch diese Methode demnach eher unterschätzt. Interessanterweise konnte für die frühe Phase der traumainduzierten septischen Lungenschädigung nach 12 h eine Erhöhung des RIPK1-mRNA-Gehaltes in den Traumatieren im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Dies ist hiermit die erste Studie, die eine RIPK1-Induktion auf mRNA Ebene in einem Tiermodell der akuten Lungenschädigung beschreibt. In diesem Zusammenhang ist eine induzierbare Expression von RIP1 durch T-Zell-Aktivierung als auch TNF-α-Stimulation vorbeschrieben [46, 105].

Auf Proteinebene konnte im Western Blot kein Unterschied im RIPK1-Proteingehalt zwischen den einzelnen Versuchsgruppen im Tierversuch ermittelt werden. Anders als Caspase-3 ist RIPK1 konstitutionell und ubiquitär im Körper exprimiert und wird nicht erst durch proteolytische Spaltung in eine aktive Form überführt. Aktive Caspase-3 Spaltprodukte können mit einem Antikörper spezifisch erfasst werden, was eine direkte Visualisierung des Silencingeffektes mittels Western Blotting bei Caspase-3 [82], nicht aber bei RIPK1 ermöglicht. Zusätzlich ist beim Western Blotting von Lungenhomogenat davon auszugehen, dass durch die Überlagerung der RIPK1-Zielproteine aus den von der RNA-Interferenz nicht betroffenen Endothel- und Bindegewebszellen kleine Unterschiede in der Regulation des Zielproteins in den Epithelzellen unterschätzt werden. Die immunhistochemische Färbung von Lungengewebsschnitten konnte diesbezüglich eine deutliche Reduktion von RIPK1 auch auf Proteinebene zu beiden Untersuchungszeitpunkten in den lungenepithelialen Zellverbänden aufzeigen.

4.2 Auswirkungen der RIPK1 siRNA Applikation auf die Inflammation bei der traumainduzierten septischen akuten Lungenschädigung

Im Folgenden soll das durch TxT und Sepsis induzierte Zyokinprofil näher analysiert werden und im Anschluss ein pathomechanistisches Erklärungsmodell für die RIPK1 siRNA vermittelten Effekte aufgezeigt werden.

Für das Zytokin G-CSF zeigte sich sowohl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit als auch in der Lunge eine ähnliche Kinetik, mit höheren Werten nach TxT+Sepsis im Vergleich zur Sham Gruppe zu beiden Zeitpunkten. Im Blutplasma lagen bereits nach 12 h deutlich erhöhte G-CSF Werte vor, die in der DH nt Gruppe nach 24 h im Vergleich zum 12 h Zeitpunkt nicht weiter stiegen. RIPK1 siRNA führte in beiden Fällen zu einer Reduktion der G-CSF Spiegel bis auf Sham Niveau. In einer vorausgehenden Studie konnte ebenfalls eine massive Erhöhung von G-CSF 24 h nach TxT + Sepsis gezeigt werden, welche lokal in der Lunge, aber nicht systemisch im Blutplasma durch Depletion neutrophiler Granulozyten gesenkt werden konnte [85]. Die Konzentrationssteigerung von G-CSF war hierbei auch durch CLP alleine, nicht aber durch ein alleiniges Thoraxtrauma induzierbar [85]. Nebst anderen Zytokinen konnte für G-CSF eine

klinisch relevante Rolle bei der Senkung der Apoptoserate neutrophiler Granulozyten gezeigt werden [19]. Dies gilt als ein wichtiger pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der lokalen Lungenschädigung, da über eine verlängerte Lebensdauer der PMNs auch deren „respiratory burst“ Kapazität und damit deren destruktives Potenzial zunimmt [19, 85]. Die Charakterisierung der Lungenschädigung jedoch (s.u.) ergab in unseren Versuchen keine Hinweise dafür, dass die Reduktion von G-CSF zu einer Reduktion lokaler Gewebsschädigung zu den untersuchten Zeitpunkten führte. Unklar bleibt in diesem Zusammenhang jedoch, ob zu späteren Zeitpunkten derartige Veränderungen zu erwarten gewesen wären.

Auch IL-1ß wirkt antiapoptotisch auf neutrophile Granulozyten [85]. In anderen Studien stieg die BAL IL-1ß Konzentration mit einem Maximum 24 h nach TxT, wobei Alveolarmakrophagen hierbei eine wichtige Mediatorquelle darstellten [50]. Bereits 48 h nach TxT war IL-1ß nicht mehr signifikant zur Kontrollgruppe erhöht [101]. Die für dieses Tiermodell vorbeschriebene IL-1ß Erhöhung in der Lunge konnte nicht reproduziert werden [85]. Die tendenzielle Zytokinerhöhung nach 12 h in der BALF mit deren Abfall auf das Niveau der Kontrollgruppe nach 24 h könnte jedoch darauf hindeuten, dass der Spitzenwert von IL-1ß noch vor dem 12 h Zeitpunkt in der BALF erreicht war und zu den Messzeitpunkten bereits rückläufig war. Auch eine Verwässerung der Zytokinspiegel durch die zweite intratracheale Instillation nach TxT ist in diesem Zusammenhang denkbar. Eine dem entgegengesetzte Zytokinkinetik war jedoch im Plasma messbar, wo die Werte für IL-1ß erst nach 24 h erhöht gegenüber der Kontrollgruppe waren. Der fehlende Einfluss der RIPK1 siRNA weist möglicherweise auf eine prädominante Rolle der myeloischen Zellpopulationen in der Lunge als Quelle von IL-1ß hin [50], welche durch die intratracheale siRNA Applikation nicht adressiert wird [79].

Die Erhöhung von IL-6 und IL-10 nach TxT + Sepsis erwies sich in Vorstudien als unabhängig von der Anwesenheit neutrophiler Granulozyten [85]. Interessanterweise scheint hierbei die Zytokinkinetik eine andere zu sein als in dem Double-Hit Modell von hämorrhagischem Schock und Sepsis: während nach TxT und Sepsis die Werte vom 12 zum 24 h Zeitpunkt im Plasma anstiegen, war zu den gleichen Zeitpunkten eine Reduktion im Modell des hämorrhagischen Schocks + Sepsis zu verzeichnen [80, 81]. Weniger eindeutig beurteilbar ist der

Verlauf der Zytokinwerte lokal in der BALF und Lunge selbst. Bereits sehr früh (30 min bis wenige Stunden) nach Thoraxtrauma ist eine proinflammatorische Antwort sowie deren antiinflammatorische Gegenregulation auf Zytokinebene lokal und systemisch messbar [50, 83, 84, 86, 101] was jedoch auf eine Freisetzung präformierter Zytokine aus dem Lungengewebe durch die mechanische Destruktion nach TxT zurückzuführen sein könnte [83].

Gleichzeitig scheint die Zytokinerhöhung zum 24 h Zeitpunkt im Double-Hit Modell von TxT + Sepsis eher Folge der CLP zu sein, da nach TxT alleine keine, nach Double-Hit oder CLP alleine jedoch eine deutliche lokale und systemische IL-6 und IL-10 Erhöhung nachweisbar war [85]. Ein mehrgipfliger komplexer Verlauf der Zytokinprofile ist demnach auch im vorliegenden Double-Hit Modell anzunehmen. Für das Thoraxtrauma ist eine enge Korrelation zwischen BALF IL-6 und Plasma IL-6 vorbeschrieben [83] und auch im vorliegenden Modell korrelierte eine Reduktion von IL-6 in der BALF mit einer Reduktion im Plasma zum 24 h Zeitpunkt in der RIPK1 siRNA Gruppe. Beim Menschen korreliert die Verletzungsschwere nach Trauma mit der Höhe der plasmatischen IL-6 Konzentrationen [24]. Patienten mit ausgeprägtem ARDS wiesen erhöhte IL-6 Werte in der BALF auf, die auch mit einer erhöhten Schädigungsrate der alveolokapillären Barriere korrelierten [67]. In Tiermodellen erwiesen sich therapeutische Interventionen auf Ebene von IL-6 mittels monoklonaler Antikörper als erfolgreich bei septischem Verbrennungstrauma [25], bei septischem Schock sind sie allerdings nur von bedingter Wirksamkeit in Abhängigkeit vom verwendeten Modell [48, 125]. Gleichzeitig korrelieren aber auch im septischen Tiermodell die IL-6 Werte mit einem schlechteren Outcome [58]. Die Applikation von RIPK1 siRNA inhibierte sowohl die IL-6 als auch IL-10 Spiegel im Blutplasma. Pathomechanistische Grundlage hierfür könnte die Herabsetzung des intraepithelialen NFκB-Signals liefern, welches speziell über die Intermediärdomäne von RIP1 vermittelt wird [70, 114], wie weiter unten beschrieben. Überlebensstudien zur lokalen als auch systemischen Applikation von RIPK1 siRNA in einem Modell der akuten Lungenschädigung fehlen bislang. Die vorliegende Studie zeigt jedoch, dass eine Reduktion der inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-10 nicht zwangsläufig auch mit einer Verbesserung des Erhaltes der alveolokapillären Barriere einhergehen.

In Vorstudien ist beschrieben, dass ein Thoraxtrauma alleine zu einem Anstieg von TNF-α im Lungenhomogenat nach 12 h führte, der jedoch je nach gewähltem Zeitpunkt in anderen Studien nicht darstellbar war [80, 83]. Während die Kombination von Hämorrhagie + Sepsis die TNF-α Konzentration in der Lunge erhöhte [82, 87], führte in einer Vorstudie mit dem hier verwendeten Double-Hit von TxT + Sepsis nur eine alleinige CLP zu einer TNF-α Erhöhung nach 24 h, ein alleiniges TxT jedoch eher zu einer Verringerung von TNF-α im Lungenhomogenat [85]. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine gemischte Form der akuten Lungenschädigung zu keiner nennenswerten Erhöhung von TNF-α in der Lunge der DH Versuchsgruppen führt. Der Ursprung der Lungenschädigung beeinflusst somit entscheidend das Zytokinprofil der pulmonalen Inflammation. Hingegen konnte im Blutplasma und in der BALF die vorbeschriebene Erhöhung von TNF-α, Fas und FasL im Zuge des Double-Hits oder deren Einzeltraumata reproduziert werden [40, 79, 82, 85, 100, 101]. Die Instillation von RIPK1 siRNA senkte die TNF-α Konzentration in der Lunge und BALF nach 24 h signifikant gegenüber der DH Kontrollgruppe und reduzierte die TNF-α Werte im Plasma auf Sham Niveau.

Weniger genau bekannt ist das Verhalten des Fas-Rezeptors und dessen Liganden im Lungenhomogenat. Nach TxT + Sepsis kam es zu einer tendenziellen Verringerung des FasL und einer signifikanten Reduktion des Fas-Rezeptors im Lungenhomogenat, ohne dass die RIPK1 siRNA hierbei einen erkennbaren Einfluss ausübte. Die Konzentration von löslichem FasL korrelierte bei ARDS hierbei mit dem Outcome beim Menschen [63]. Jedoch zeigen andere Studien, dass diese Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren sind. Vielmehr besteht beim Menschen eine komplexe Abhängigkeit von Lungenschädigung, Mortalität und Zytokinkonzentration. Weniger die absolute BALF TNF-α Konzentration als vielmehr das Verhältnis von TNF-α zu dessen löslichen Rezeptoren (sTNFR-I + II) korrelierten beispielsweise mit dem Ausmaß der Lungenschädigung, nicht aber mit der Mortalität [78].

Die Rolle der Fas-FasL Interaktion im Zuge der akuten Lungenschädigung ist ein weitläufig akzeptiertes pathogenetisches Erklärungsmodell [63, 86]. Erwartungsgemäß würde man eher mit einer Zunahme der Fas-Rezeptor Konzentration rechnen, wie es für dessen mRNA Gehalt in der Lunge bei

Hämorrhagie + Sepsis bereits gezeigt wurde [87]. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme könnte in der Funktionalität des CD95-Rezeptors liegen. Die Trimerisierung des Rezeptors nach Interaktion mit dessen Liganden, gefolgt von dessen Internalisierung ist ein essenzieller Schritt in der Bildung des DISC [7, 111]. Diese Trimerisierung, Internalisierung und konsekutive intrazelluläre Modifikation des Rezeptors könnte eine Erklärung dafür sein, warum im quantitativen immunologischen Nachweisverfahren eine geringere Fas-Rezeptor und –Ligand Konzentration im Lungenhomogenat erfasst wurde, obwohl dessen Transkription und Aktivitätslevel tatsächlich aber erhöht sind.

Sowohl in der BALF, noch deutlicher aber in Lunge und Blutplasma zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Chemokine MCP-1, KC und MIP-2 als Folge von TxT + Sepsis vom 12 zum 24 h Zeitpunkt. Angesehen als wichtige chemotaktische Mediatoren für neutrophile Granulozyten sind bereits nach alleinigem Thoraxtrauma sehr früh (bereits 2 h nach Trauma) Chemokinerhöhungen nachweisbar [79, 86]. Während bei der indirekten akuten Lungenschädigung durch hämorrhagischen Schock und Sepsis antiapoptotische siRNA-basierte Interventionen mit einer Reduktion chemotaktisch aktiver Mediatoren einhergingen [82], führte im Modell einer gemischten Form der Lungenschädigung durch TxT + Sepsis Caspase-3 siRNA zu einer Erhöhung. SiRNA Interventionen auf Ebene von Fas oder dessen intrazellulären Adapters FADD reduzierten hingegen auch diese Zytokine teilweise signifikant [68]. Direkte RNA-Interferenz auf Ebene des Chemokins MIP-2 reduzierte auch den konsekutiven Einstrom neutrophiler Granulozyten gemessen an der Myeloperoxidaseaktivität [56]. MCP-1 scheint eine Schlüsselrolle bei der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge zu spielen, wobei ein Synergismus zwischen MCP-1 und bakteriellem Endotoxin bei der Verstärkung der Inflammation und der Störung der bronchoalveolären Barriere zu bestehen scheint [64]. Auch wurde MCP-1 eine direkte und indirekte Rolle bei der Schwächung der Atemmuskulatur im Zuge des septischen Geschehens zugewiesen, wobei sich eine direkte Inhibition über einen monoklonalen Antikörper als therapeutischer Ansatzpunkt im Tiermodell erwies [44]. RIPK1 siRNA Applikation führte im Lungenhomogenat zu einer Senkung des Chemokingehaltes zum 24 h Zeitpunkt, wie auch von KC und MIP-2 in der BALF nach 24 h und MCP-1 im Plasma zu beiden Zeitpunkten.

Die tierexperimentellen Ergebnisse der Entzündungsreaktion bei ALI zusammenfassend soll im Folgenden versucht werden, eine pathomechanistische Erklärung für die beobachteten Effekte von RIPK1 siRNA im Double-Hit Modell von Thoraxtrauma und Sepsis zu finden.

Die intratracheale Applikation von siRNA, unabhängig von deren Zielstruktur, führt zu einer Aufnahme in Epithelzellen, nicht aber ortständige Makrophagen, wie immunhistologisch mit Cy5-gelabelter siRNA und gleichzeitiger Cytokeratin-18 oder CD115-Färbung gezeigt wurde [87]. Lungenepithelzellen selbst wiederum gelten als wichtige Quelle von Zyto- und Chemokinen bei der akuten Lungenschädigung, wobei der Aktivierung des von ihnen exprimierten CD95 (Fas-)Rezeptors eine wichtige Rolle hierbei zugesprochen wird [4, 81]. Die Vermittlung der proinflammatorischen Effekte der Fas-Rezeptoraktivierung erfolgt einerseits über ERK und JNK [20, 81], andererseits wurde auch eine vermehrte Aktivierung von NFκB nach CD95-Aktivierung beschrieben [20, 21, 42]. Desweiteren folgerten Messer et al., dass neben Fas auch andere Todesrezeptoren bei der Ausbildung des inflammatorischen und apoptotischen Geschehens bei Double-Hit durch Thoraxtrauma + Sepsis beteiligt sein könnten [68]. So wurde für TNF-defiziente Mäuse eine Reduktion der Lungenschädigung nach Hämorrhagie und Sepsis [55] wie auch nach TxT und Sepsis beschrieben [127]. Der TNF-Rezeptor ist ebenfalls ein Mitglied der Todesrezeptorfamilie, der seine apoptotische Wirkung über den DISC, die inflammatorische Funktion jedoch direkt über NFκB vermittelt [39]. Für die Bildung der inflammatorischen Mediatoren ist wie eingangs beschrieben die Intermediärdomäne von RIP1 essenziell, um nach Ubiquitinylierung als Gerüstmolekül für die Rekrutierung des NFκB-aktivierenden TAK1-TAB1-TAB2-Komplexes zu dienen [47, 70, 109, 114].

Eine mögliche pathomechanistische Erklärung für die beobachtete sowohl lokale als auch systemische Reduktion der Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren ist die Herabsetzung des NFκB-Signals auf Ebene der alveolären und respiratorischen Epithelzellen. Alternativ ist RIP1 auch bei der Aktivierung der Kinasen p38 MAPK, ERK und JNK beteiligt [21], welche wiederum in die Freisetzungen von Chemokinen aus murinen Lungenepithelzellen involviert sind [20, 81]. Farnand et al. berichten allerdings, dass in deren *in vitro* Modell in MLE12 Zellen eine reine NFκB Inhibition nicht ausreichend war, um die Freisetzung von

KC als Folge von Jo-2 Stimulation zu unterbinden, im Gegensatz zur Inhibition von ERK. Durch Inhibition von NFκB wurde die TNF-α induzierte KC Freisetzung unterbrochen [20]. Denkbar wäre demnach auch eine kombinierte Wirkung des RIPK1 Knockdowns über NFκB einerseits und ERK / JNK andererseits, welche dann zu einer Suppression der Zytokinfreisetzung aus respiratorischen Epithelzellen führen würde (Abb. 24). Die Involvierung von RIP1 in die Signaltransduktion von der Todesrezeptoraktivierung aus bis hin zur Zytokinfreisetzung ist in Zellmodellen wie oben aufgeführt bereits detailliert beschrieben. Es fehlen bislang jedoch Studien, die die pathomechanistische Relevanz der Erkenntnisse aus Zellmodellen in klinisch relevanten Tiermodellen aufzeigen. Die vorliegende Studie dient somit als ein erstes Bindeglied zwischen den *in vitro* und *in vivo* Erkenntnissen. Interessant ist demnach für zukünftige Studien die Fokussierung auf weitere Elemente der Signaltransduktionskette proximal und distal von RIP1 (Abb. 24), um den hier aufgezeichneten möglichen Pathomechanismus der durch RIPK1 Silencing beobachteten Effekte weiter zu untermauern.

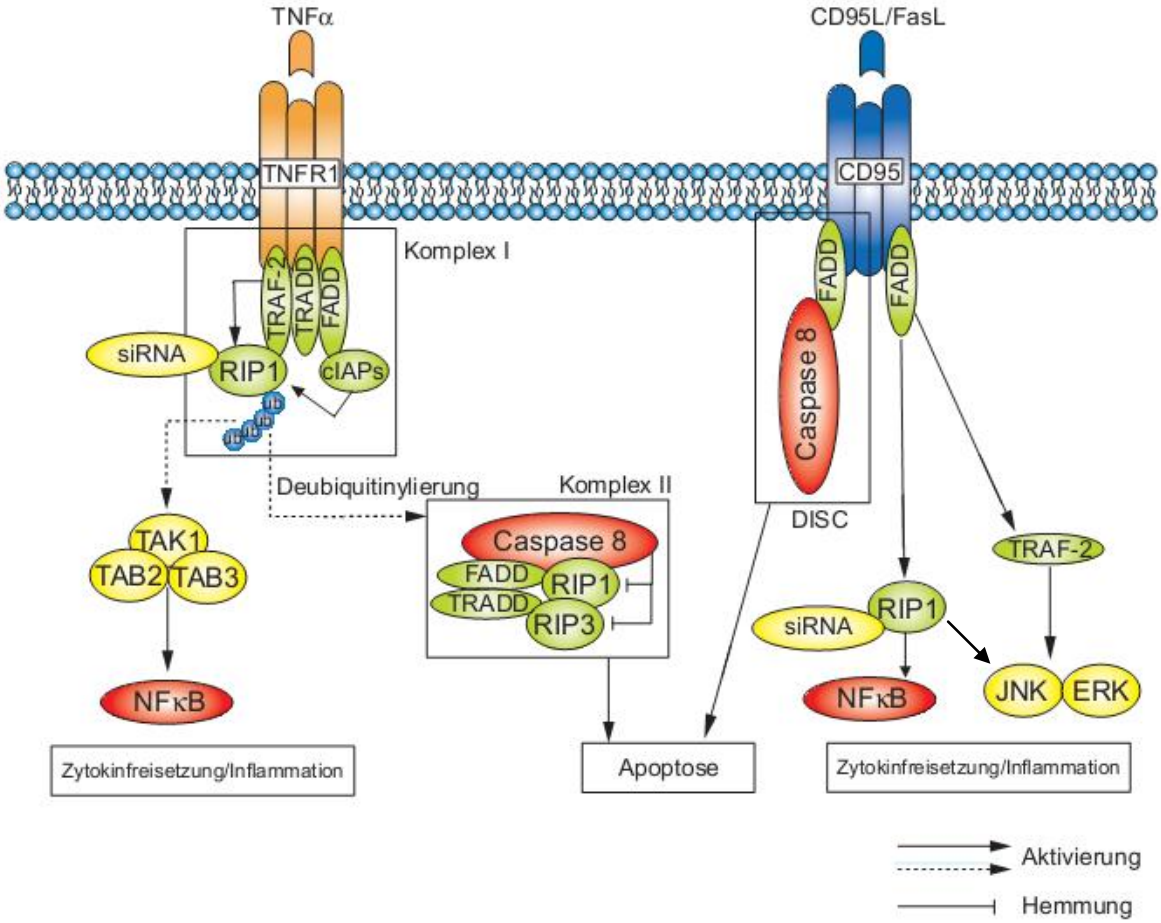


Abb. 24: Erklärungsmodell der RIPK1 siRNA vermittelten Effekte auf Alveolarepithelzellen im Tiermodell. Über einen Knockdown von RIP1 wird sowohl die TNF-α + Fas-vermittelte NFκB Aktivierung als auch die Fas-vermittelte JNK/ERK Aktivierung kompromittiert, wobei die Apoptose unbeeinträchtigt bleibt. Symbolerklärung: cIAPs (cellular Inhibitors of Apoptosis), FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), TRADD (TNFR1-associated death domain protein), TRAF-2 (TNF receptor-associated factor), RIP1/3 (Receptor Interacting Protein Kinase 1/3), NFκB (Nuclear Factor kappa-B), JNK (c-Jun N-terminal kinase), ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase), ub (Ubiquitin), TAK1 (Transforming Growth Factor ß-associated Kinase 1), TAB2/3 (*TAK*-1-Binding Protein 2/3), TNF-α (Tumor Necrosis Factor-alpha), TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1). Modifiziert nach [21, 121], Modifikation und Nachdruck genehmigt durch Macmillan Publisher Limited: Cell Death and Differentiation [21], ©2007 und Nature Reviews Molecular Cell Biology [121], ©2010.

In Gesamtschau der Ergebnisse der Zytokinveränderungen im Lungenhomogenat, Blutplasma und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit fällt im Vergleich der non-targeting siRNA mit der RIPK1 siRNA DH Gruppe auf, dass eine Reduktion sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Mediatoren vorwiegend zum 24 h Zeitpunkt in der RIPK1 Gruppe zu verzeichnen war. In der MPO Aktivitätsmessung zeigte sich keine relevante Aktivitätssteigerung in den Traumagruppen. Zum 24 h Zeitpunkt nahm auch die intraalveoläre Zellzahl signifikant zu. Wie sich in der Zelldifferenzierung zeigte, trugen hierzu neutrophile Granulozyten bei, deren relativer Anteil stieg. Auch Alveolarmakrophagen, welche die prozentual größte Gruppe der Zellen darstellten, waren vermehrt intraalveolär auffindbar, wie der

Anstieg der Gesamtzellzahl verdeutlicht. Alveolarmakrophagen waren nach alleinigem Thoraxtrauma nicht nur vermehrt in der BALF nachweisbar [99], sie sind hierbei auch selbst wichtige Mediatorquellen proinflammatorischer Zytokine und Chemokine [50, 99].

Offen bleibt, ob die beobachteten reduzierten Konzentrationen pro- und antiinflammatorischer Mediatoren, insbesondere der Chemokine, nach RIPK1 siRNA Instillation zu späteren Zeitpunkten zu einer Reduktion der pulmonalen Neutrophilenrekrutierung führen. Eine einmalige Inhibition von MIP-2 per siRNA war ausreichend, um in einem Double-Hit Modell von Hämorrhagie und Sepsis die pulmonale Einwanderung von neutrophilen Granulozyten zu senken [56]. Die immunhistochemische Färbung von RIPK1 Protein zeigte, dass zum 24 h Zeitpunkt das Zielprotein noch supprimiert war. Dadurch ist davon auszugehen, dass die Silencingeffekte auch nach dem 24 h Zeitpunkt noch anhalten. Spätere Zeitpunkte wurden in der vorliegenden Studie nicht adressiert. Interessanterweise ist jedoch die hier gewonnene Erkenntnis, dass eine Reduktion der proinflammatorischen Zytokine zu keiner Verminderung von PMN in der BAL führt komplementär zu den Ergebnissen, dass nach PMN Depletion dennoch eine Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen nach TxT und Sepsis zu verzeichnen war [85]. Dies untermauert die Erkenntnis, dass bestimmte Zytokinspiegel nicht zwangsläufig mit der An- oder Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten in der Lunge korrelieren.

Eine weitere Erklärung für die Diskrepanz zwischen Zytokinmessung und Neutrophilenrekrutierung ist gegebenenfalls durch die Experimente von Park et al. gegeben: Die tatsächliche Bioaktivität der pro- und antiinflammatorischen Zytokine hängt nicht ausschließlich von deren Konzentration in den Organsystemen ab, sondern vielmehr von deren relativen molaren Verhältnis zu parallel vorliegenden inhibitorischer Agenzien (z.B. sTNFR-I+II, IL-1RA, sIL-6R…) im gleichen Organsystem [78]. So konnte beispielsweise bei Patienten mit ARDS nur für das Zytokin IL-1ß eine gute Korrelation von dessen Konzentration mit dessen *in vivo* Bioaktivität gefunden werden [78]. Sinnvoll wäre deshalb, in zukünftigen Studien mittels spezifischer Assays die Netto-Bioaktivität der relevanten Zytokine parallel mit deren Konzentration und der ihrer natürlichen Inhibitoren zu bestimmen.

Hierdurch wäre eventuell besser abschätzbar, ob eine Veränderung eines Zytokins durch Interventionen auch klinische Relevanz im Biosystem zuteil wird.

4.3 Auswirkungen der RIPK1 siRNA Applikation auf die Apoptose und Barrierestörung bei der traumainduzierten septischen akuten Lungenschädigung

Bei der Quantifizierung der Apoptoserate wurde im Western Blotting der aktiven Caspase-3 keine, in der Auszählung der TUNEL-gefärbten Gewebsschnitte eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate in der Lunge festgestellt. Die Quelle dieser messbaren Apoptoserate wurde deskriptiv bei ARDS Patienten als erhöhte Apoptose von Typ-II Alveolarepithelzellen identifiziert [2] und auch nach experimentellem Thoraxtrauma wurde diese Apoptose in Typ-II-Zellen beschrieben [49, 101]. Das Ausmaß der Apoptoserate korrelierte hierbei wiederum mit dem Ausmaß der Schädigung der alveolokapillären Barriere, gemessen am Proteingehalt der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit in Tiermodellen der akuten Lungenschädigung [68, 79, 82]. Erwähnenswert ist in dieser Hinsicht auch, dass das Thoraxtrauma wahrscheinlich auch unabhängig von der sich entwickelnden Zellapoptose die alveolokapilläre Barriere schon sehr früh (wenige Minuten nach TxT) stört [83, 86]. Diese frühe Barrierestörung kann in dem vorliegenden Modell durch die gewählten Zeitpunkte nicht erfasst werden. Dennoch korreliert auch in diesem Modell von TxT + Sepsis die Apoptoserate mit der Lungenschädigung gemessen an dem Proteingehalt der BALF und der typischen Histologie. Die Applikation von RIPK1 siRNA scheint auf dieser Ebene keine positiven Effekte auf Apoptose und die Barrierestörung zu haben.

Die Reduktion von RIPK1 in alveolären Epithelzellen führte weder zu einer Erhöhung noch zu einer Senkung der Apoptoserate, obgleich RIPK1 direkt bei der Bildung des zytoplasmatischen DISC beteiligt ist [76]. Jedoch scheint RIPK1 nicht direkt für die intrazelluläre Fortführung der durch Todesrezeptoren initiierten Apoptosekaskade nötig zu sein, da sowohl RIP1 als auch RIP3 durch Caspase-8 in einem sehr frühen Schritt der extrinsischen Apoptose proteolytisch gespalten werden und somit keine enzymatische Funktion im zytoplasmatischen DISC mehr wahrnehmen [121]. Hierbei ist für das C-terminale Spaltprodukt von RIP1 eine

apoptosefördernde Wirkung im Sinne einer forcierten Bildung des DISC nach TNFR-I Aktivierung beschrieben [39]. Jedoch war in unseren Versuchen durch das weitgehende Fehlen von RIP1 und somit auch dessen C-terminalen Spaltproduktes ein derartiger Effekt nicht erkennbar und die Apoptoserate blieb unverändert.

Silencing von Caspase-8 durch siRNA bei Hämorrhagie + Sepsis erwies sich als nicht effektiv in der Reduktion der pulmonalen Inflammation und führte auch zu keiner Reduktion der Aktivität von Caspase-3 [87] [79]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch die Inhibition von Caspase-8 eine vermehrte RIPK1 Akkumulation erfolgt, da RIPK1 wie oben beschrieben im Zuge der Apoptosekaskade durch Caspase-8 proteolytisch gespalten wird. RIPK1 Akkumulation wiederum führt zu einer vermehrten Bildung von NFκB und unterhält dadurch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine [21].

Andererseits muss bedacht werden, dass wenn die oben beschriebene antiinflammatorische Wirkung von RIPK1 siRNA *in vivo* über NFκB vermittelt wird, auch eine Steigerung der Apoptoserate resultieren könnte, da NFκB auch als Promotor antiapoptotischer intrazellulärer Prozesse dient [3]. Auch Tumore bedienen sich dieser NFκB Wirkung, um die Zelltodrate zu senken [77].

Die Verwendung von RIPK1 siRNA in tierexperimentellen Untersuchungen beschränkt sich bisher auf die systemische Applikation in einem CLP Sepsis Modell [66]. Hierbei wiesen die Tiere in der RIPK1 siRNA Gruppe jedoch eine erhöhte Mortalität auf, was auf die Funktion von RIP1 in der Mobilisation der hepatischen Glykogenspeicher zurückgeführt wurde. Eine Beschreibung der Auswirkungen von RIPK1 Knockdown auf Inflammation und Apoptose blieb jedoch aus [66]. In diesem Sinne ist dies die erste Studie, die eine Beschreibung der Effekte auf Inflammation und Zelltod bei Verwendung von RIPK1 siRNA *in vivo* gibt.

Andere Studien konzentrierten sich auf die spezifische Inhibition der Kinasedomäne von RIP1 mit Necrostatin-1 und die durch sie vermittelte necroptotische Signalkaskade. Es wurde hierbei über einen fehlenden Einfluss auf die Apoptose [74, 131] oder eine Erhöhung der Apoptoserate berichtet [66]. Andere Studien beschränken sich auf eine rein morphologische Beschreibung der

jeweiligen Schädigung ohne Beschreibung der Apoptose [16, 95, 102, 130]. Ein positiver Einfluss auf Inflammation durch Necrostatin-1 wurde für SIRS und die neonatale hypoxisch-ischämische Hirnschädigung beschrieben [18, 74]. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass durch Silencing von RIPK1, eines wesentlichen Mediators der necroptotischen Kaskade, keine Reduktion der pulmonalen Schädigung erreicht werden kann.

4.4 Einfluss von Necrostatin-1 und RIPK1 Silencing auf die Inflammation und Apoptose *in vitro*

Weder Fernand et al. nach Jo-2 Stimulation [20] noch wir im vorliegenden Zellmodell beobachteten durch TNF-α Stimulation eine nennenswerte Reduktion der Zytokinfreisetzung (IL-6, KC, MCP-1) aus MLE12 Zellen nach RIPK1 Silencing. Trotz des effektiven Knockdowns des Zielproteins RIPK1, wie er im Western Blot zu den untersuchten Zeitpunkten erkennbar war, ist unklar, ob hierbei intrazellulär verbliebene Restmengen des Proteins für das Ergebnis verantwortlich waren. Zu bedenken ist, dass neben RIPK1 allerdings auch andere Multiadapterproteine wie FLIP (FLICE inhibitory protein) eine Rolle bei der Regulation der Apoptose und Inflammation spielen [110]. Sowohl die Jo-2 als auch TNF-α Stimulation im *in vitro* Modell zeigen jedoch, dass von Ergebnissen *in vitro* nicht direkt auf die Auswirkungen *in vivo* zurückgeschlossen werden kann und umgekehrt. So ist es denkbar, dass die antiinflammatorische Wirkung eines lokalen RIPK1 Knockdowns im *in vivo* Kontext nur aufgrund des komplexeren Milieus (gleichzeitige Aktivierung mehrerer Todesrezeptoren, vorliegen von sowohl apoptotischen als auch nekrotischen Zelldebris, …) beobachtet werden kann. Es besteht bis dato kein Zellmodell, dass die komplexen Zusammenhänge von Thoraxtrauma und/oder Sepsis mit der Ausbildung einer akuten Lungenschädigung ausreichend *in vitro* wiederspiegelt.

In einer durchflusszytometrischen Analyse sollte auch geklärt werden, ob in murinen Lungenepithelzellen und Makrophagen eine RIPK1 Inhibition mittels Necrostatin-1 nach TNF-α Stimulation Einfluss auf die Zelltodrate hat. Die zur Necroptose befähigten L929 Zellen reagieren auf TNF-α sehr sensibel mit einer hohen Zelltodrate, welche durch den Pancaspaseninhibitor zVAD-fmk noch weiter

erhöht wird. Durch Applikation von Necrostatin-1 jedoch kann der TNF-α induzierte Zelltod inhibiert werden, selbst bei gleichzeitiger Caspaseninhibition durch zVAD-fmk [53, 122, 123]. Für die MLE12 als auch MHS Zellart ist das Reaktionsverhalten auf TNF-α und andere Todesrezeptorliganden bisher jedoch nur unzureichend charakterisiert, speziell in Bezug auf die gleichzeitige An- oder Abwesenheit von Necrostatin-1. Jedoch gerade die *in vitro* Charakterisierung des Zelltodverhaltens der essenziellen Komponenten der alveolokapillären Barriere ist wichtige Voraussetzung, um von der *in vivo* beobachteten Zerstörung der epithelialen Barriere Rückschlüsse auf den Pathomechanismus der zellulären Desintegration ziehen zu können.

Durch den vorliegenden Versuchsaufbau konnte in MLE12 und MHS Zellen ein apoptotisches Reaktionsverhalten beobachtet werden. Hierbei änderte sich durch die zusätzliche Gabe von Necrostatin-1 die Zelltodrate gegenüber den korrespondierenden Kontrollen nicht, zVAD-fmk hingegen reduzierte die Zahl Annexin V- und 7-AAD-positiver Zellen. Die höheren Schwankungen in der Zelltodrate der MHS Zellen sind möglicherweise auf die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Lösungsmittel DMSO zurückzuführen. Dieses stellte sich in eigenen Vorversuchen selbst als potentes Mittel zur Zelltodinduktion in MHS, weniger jedoch MLE12 oder L929 Zellen heraus. Teilweise waren Konzentrationen von 0,05 % ausreichend für eine Zelltodinduktion in MHS Zellen, während selbst bei 1 % DMSO in MLE12 und L929 Zellen keine erhöhte Zelltodrate gemessen werden konnte.

Der Grund für die fehlende Befähigung von MLE12 und MHS Zellen zum necroptotischen Zelltod liegt gegebenenfalls in der Ausstattung intrazellulärer Signalmoleküle. So ist die zellartabhängige Expression des Moleküls RIPK3 mit der Fähigkeit einer Zellart zu caspaseunabhängigem Zelltod assoziiert, wobei in pulmonalen Tumorzelllinien eine generell niedrigere RIPK3 Expression gefunden wurde [27]. Die fehlende RIPK3 Expression in den hierbei getesteten Lungenkarzinomzelllinien H2009 und NCI-460 war mit einer fehlenden Induzierbarkeit von Necroptose verbunden, trotz des Vorhandenseins von RIPK1 [27]. Die Adressierung von RIPK3 und der endogen antiapoptotischen Proteine (cIAPs) in Lungenepithelzellen *in vivo* und *in vitro* in zukünftigen Studien kann

dazu beitragen, die Ursachen des rein apoptotischen Zelltodverhaltens und deren inflammatorische Reaktion weitergehend zu verstehen.

Im Gegensatz hierzu konnte erst kürzlich in einem Mausmodell nach Infektion mit dem H1N1 Influenza Typ A Virus ein necroptotisches Zelltodverhalten von Atemwegsepithelzellen beobachtet werden [94]. Voraussetzung hierfür war allerdings die Inhibition der Apoptose durch Verwendung von Birc3$^{-/-}$ Knockout-Mäusen, in welchen die Produktion von antiapoptotischem cIAP2 defizitär ist [72]. Sowohl die systemische Necrostatin-1 Applikation als auch RIPK3 Deletion resultierten hierbei in einer Reduktion der epithelialen Barrierestörung und einer verminderten Bildung des Necrosom-Komplexes [94]. Einschränkend gilt jedoch hier, dass keine Aussage über das Zelltodverhalten der distalen alveolären Lungenepithelien getroffen wurde. Auch bezogen sich die Blottings der Immunopräzipitate der zytoplasmatischen necrosomalen Proteinkomplexe auf Lysate aus Lungenvollhomogenat, ohne Möglichkeit der Differenzierung, in welchen Zellpopulationen die Komplexbildung abläuft.

In Bezug auf die MHS Zelllinie adressierte bis dato keine Studie explizit das Zelltodverhalten unter RIPK1 Inhibition. Makrophagen zeigen jedoch nicht generell ausschließlich apoptotisches Zelltodverhalten, wie für die RAW 264.7 Makrophagenzelllinie gezeigt werden konnte [65]. Interessanterweise scheint hier die Phosphorylierung der Proteinkinase B im Akt Signalweg eine bedeutende Rolle sowohl in der Ausbildung des necrosomalen Proteinkomplexes als auch in der autokrinen TNF-α Freisetzung zu spielen [65]. Weng et al. beschrieben dahingehend eine RIP1-RIP3-Caspase-8 abhängige nicht-apoptotische Zytotoxizität durch Infektion von Knochenmarksmakrophagen mit Yersinia pestis, nicht jedoch bei Salmonelleninfektion oder LPS-Stimulation [128]. In dieser Studie war der hierdurch induzierte Zelltod auch unabhängig von Todesrezeptorliganden wie TNF-α und FasL [128]. In Gesamtschau kann demnach festgestellt werden, dass der durch Todesrezeptorliganden induzierte Zelltod nicht nur zelltypspezifisch ist, sondern auch durch das pathogene Milieu wesentlich beeinflusst wird. Kritisch ist hierbei anzumerken, dass keine einfachen Rückschlüsse von tierexperimentellen polymikrobiellen Sepsismodellen, wie nach zäkaler Ligation und Punktion, auf den Kontext der Sepsis beim Menschen

möglich ist, zumal das intestinale Mikrobiom der Maus und des Menschen grundlegende Unterschiede aufweist [73].

Interessanterweise zeigte sich in unserem Zellmodell eine tendenzielle Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität sowohl für TNF-α in MLE12 als auch Jo-2 in MHS Zellen nach RIPK1 Knockdown ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Ähnlich wie bei der Neutrophilenrekrutierung *in vivo* bleibt auch hier offen, ob zu späteren Zeitpunkten im Zellmodell oder *in vivo* eine proapoptotische Wirkung des RIPK1 Silencings erfolgt, da über die Aktivierung von RIPK1 in der NFκB Signalbildung auch antiapoptotische Effekte beschrieben wurden [3].

Die Klärung der intrazellulären todesrezeptorvermittelten Signalwege bezogen auf den speziellen Fall der murinen Lungenepithelzellen bedarf demnach noch weiterer Forschung, zumal sich viele der Studien bezüglich alternativer Zelltodmechanismen auf hämatopoetische Zelllinien oder Fibroblastenzelllinien beziehen. Auch ist zu bedenken, dass zur Charakterisierung des Zelltodes in zukünftigen Studien die Kombination pharmakologischer, molekulargenetischer und morphologischer Kriterien zur Beschreibung von Zelltod genutzt werden sollte, um eine genauere Abgrenzung zwischen primär apoptotischen, nekrotischen und necroptotischen Formen des Zelltodes zu ermöglichen [120].

4.5 Einschränkungen der Studie

Es ist nicht auszuschließen, dass bei neuen synthetischen siRNAs neben den gewünschten spezifischen Knockdowneffekten auch off-target Effekte auftreten, obwohl die intratracheale Applikation von siRNA in ähnlichen Tiermodellen [79] wie auch die systemische Applikation nakter siRNA [28] bisher keine Hinweise auf diese Nebenwirkungen lieferten. Sowohl die gewünschten Silencingeffekte als auch die off-target Effekte und die immunstimulatorischen Komponenten exogen zugeführter RNA scheinen dosisabhängig, sequenzspezifisch, zelltypspezifisch und abhängig von der Länge der RNA-Segmente zu sein [93, 119]. Die Verwendung von non-targeting siRNA in Sham und DH Tieren kann demnach nur mit Einschränkungen als Kontrollgruppe dienen. Eine mögliche Abhilfe hierbei wäre die zusätzliche Bestimmung der IFNα- und/oder IL-12-Konzentration in den

gewonnenen Untersuchungsmaterialen bei Neuetablierung einer zuvor nicht verwendeten siRNA sowohl in der Sham als auch DH Gruppe [93], was in der Literatur bis dato nur bei wenigen siRNA Applikationen erfolgte [79]. Andere Autoren empfehlen hierbei generell die Erfassung von siRNA Dosis-Wirkungs-Kurven [119]. Auch die Einführung einer weiteren Versuchsgruppe sham + targeting siRNA kann der Erkennung von sequenzabhängigen und –unabhängigen Nebenwirkungen dienen.

Es gilt weiterhin, dass mit einer intratrachealen siRNA Applikation kein vollständiger Knockdown der Ziel-mRNA erreicht werden kann. Obwohl die immunhistochemischen Analysen des RIPK1-Proteins der Lungengewebsschnitte eine deutliche Verminderung zu den beiden Untersuchungszeitpunkten nach 12 und 24 h zeigen, so kann – auch in Anbetracht der Ergebnisse des Western Blottings - nicht ausgeschlossen werden, dass Restmengen des Proteins RIPK1 nicht doch für alternative Signalwege zur Verfügung standen. Deletäre Effekte durch eine vollständige RIPK1 Ziel-Proteinelimination in den Lungenepithelzellen wären durchaus denkbar, zumal über den hypothetischen Signalweg über NFκB auch Überlebenssignale gebildet werden [21] und für RIPK1 Knockoutmäuse gezeigt werden konnte, dass diese nach wenigen Tagen an einer massiv gesteigerten Apoptose in lymphoidem und adipösem Gewebe versterben [38, 114]. Zelltypspezifische Knockout Tier- und Zellmodelle könnten dazu beitragen, die pathomechanistische Funktion einzelner Signalmoleküle besser zu verstehen. Dennoch bietet die siRNA Applikation in diesem Zusammenhang gleichzeitig die Möglichkeit auch therapeutische Anwendungsmöglichkeiten aufzuzeigen, was durch Knockoutmodelle nicht möglich ist.

Der Vergleich eines RIPK1-Knockdowns mit einer singulären Inhibition der Kinasedomäne von RIPK1 durch Necrostatin-1 wäre wünschenswert gewesen. Lokale Applikationsprotokolle für Necrostatin-1 sind bisher für Retina [95], Gehirn [74, 131] und Herz [102] beschrieben, systemische für SIRS [18], Sepsis [53, 66] und ischämische Nierenschädigung [52]. Instillationsversuche von Necrostatin-1 und zVAD-fmk erwiesen sich in eigenen Versuchen jedoch als nicht effektiv. Die wenigen etablierten Instillationsprotokolle des Pancaspaseninhibitors zVAD-fmk [104, 116, 135] sind bisher nur für ausgewählte Schädigungsmuster durch intratracheale E. coli-, Noradrenalin- und AT-II-Instillationen beschrieben, nicht

aber für ALI/ARDS. Nicht selten wird deshalb auf systemische Gabe (intraperitoneal, intravenös, subcutan) von zVAD-fmk ausgewichen [34]. Die hohe Konzentration oberflächenaktiver Substanzen in der Surfactantflüssigkeit, in Verbindung mit der kurzen Halbwertszeit von Necrostatin-1 von etwa 1 h [36], könnte eine ausreichende Wirkung von Necrostatin-1 und zVAD-fmk bei einfacher Instillation verhindern. Es bleibt unklar, ob alternative Behandlungen wie der Einsatz von Verneblerapparaten [104] die lokale Applikation dieser Inhibitoren ermöglicht. Einschränkend ist bei obigen Studien jedoch zu bemerken, dass der Einsatz des oft verwendeten Lösungsmittels DMSO als Vehikelkontrolle in Konzentrationen von 0,2 [66] bis zu 15 Vol-% [34] problematisch ist. In eigenen Experimenten erwies sich in diesem Zusammenhang speziell für die MHS-Zelllinie eine Konzentration von 0,05 % bereits als ausreichend starker Induktor von Zelltod nach 24 h. Eine Interpretation dieser Studien sollte deshalb mit Vorsicht erfolgen.

4.6 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie untersuchte erstmalig die pathomechanistische Bedeutung des Multiadapterproteins RIPK1 in einem klinisch relevanten Modell der traumainduzierten septischen akuten Lungenschädigung. Es konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von RIPK1 in Alveolarepithelzellen mit einer Reduktion der durch Thoraxtrauma und Sepsis bedingten lokalen und systemischen Inflammation assoziiert ist. Die pathomechanistische Bedeutung von RIPK1 in die NFκB-vermittelte Inflammation und Zytokinproduktion ist aus Vorstudien gut charakterisiert. Diese Studie dient somit als Brücke zwischen der aus Zellmodellen bekannten Funktion von RIPK1 und der pathomechanistischen Bedeutung im Tiermodell.

Im Zellmodell wurde gezeigt, dass Silencing von RIPK1 keinen Einfluss auf die TNF-α induzierte Apoptose hat. Im Gegensatz zum tierexperimentellen Teil ist im Zellmodell kein Rückgang der Zytokinproduktion nach RIPK1 Silencing festgestellt worden, wie es auch schon in anderen Studien belegt wurde [20]. Im vorliegenden Fall kommt die RIPK1 siRNA vermittelte Reduktion der Inflammation im komplexen Tiermodell zum Tragen. Wichtige Milieufaktoren in der nach Thoraxtrauma und Sepsis geschädigten Lunge, wie die Interaktion von epithelialen

und myeloischen Zellen, nekrotischer und apoptotischer Zelldebris sowie lokale Zytokine könnten hierbei eine entscheidende Rolle spielen.

Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Inflammation nach RIPK1 siRNA Instillation nicht zwangsläufig mit einer Besserung der Integrität der alveolokapillären Barriere im vorliegenden Modell der traumainduzierten septischen Lungenschädigung einhergeht und die pulmonale Apoptose unbeeinflusst bleibt. In Gesamtschau mit anderen Studien [68, 79, 82] legen die hier vorgenommenen Untersuchungen nahe, dass die Apoptose pulmonaler Epithelzellen und nicht die Inflammation der Lunge den dominanten Schädigungsmechanismus in der traumainduzierten septischen akuten Lungenschädigung darstellen könnte.

Die vorliegenden Untersuchungen bieten somit neue Impulse für zukünftige Studien, in denen die dämpfende Wirkung der RIPK1 siRNA auf die lokale und systemische Inflammation genutzt werden könnte, um eine Augmentation der Wirkung antiapoptotischer siRNA-basierter therapeutischer Strategien zu erreichen. Zukünftige Studien sollten sich aber auch auf die Aufdeckung weiterer relevanter Komponenten der enzymatischen Kaskade der Inflammation wie des TAK1-TAB2-TAB3 Komplexes, JNK, ERK und NFκB konzentrieren, um die klinische Relevanz der einzelnen Proteine der molekularen Signaltransduktion näher zu beleuchten und neue therapeutische Ansätze aufzuzeigen.

5. Zusammenfassung

Apoptose und Inflammation stellen relevante Pathomechanismen bei der Ausbildung der akuten Lungenschädigung dar. Gleichzeitig ist jedoch die Rolle der einzelnen Komponenten intrazellulärer apoptotischer und inflammatorischer Signalwege gerade in den Alveolarepithelzellen noch weitgehend ungeklärt.

Durch intratracheale Applikation von siRNA (small interfering Ribonucleic Acid) in Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung einzelner Zielproteine selektiv in der respiratorischen Epithelzellschicht möglich ist. Hierdurch wird eine Aufklärung dieser Signalwege möglich, wobei gleichzeitig eine therapeutische Bewertung der siRNA Applikation ermöglicht wird. Ziel dieser Studie war deshalb, die Rolle des in zahlreiche Signalwege involvierten Multiadapterproteins RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1) in einem klinisch relevanten Modell der traumainduzierten septischen Lungenschädigung zu untersuchen.

Männliche C57BL/6 Mäuse wurden einem stumpfen Thoraxtrauma unterzogen. 24 h (Stunden) später wurde eine polymikrobielle Sepsis induziert. 24 h vor und 12 h nach Thoraxtrauma wurden 100 µg RIPK1 siRNA oder eine unspezifische non-targeting siRNA intratracheal appliziert. Weitere Kontrolltiere erhielten non-targeting siRNA ohne die entsprechenden Traumata. Die lokale und systemische Inflammation und Apoptose wurde 12 und 24 h nach Sepsis charakterisiert und die Ergebnisse in einem Zellmodell rekapituliert.

Der Knockdown von RIPK1 wurde erfolgreich auf Zellebene etabliert, mit ausgeprägten Silencingeffekten auf mRNA- (messenger Ribonucleic acid) und Proteinebene nach 12, 24 und 36 Stunden. Im Tiermodell konnte das RIPK1 Silencing in den Lungenepithelzellen auf mRNA Ebene nach 12 h und immunhistochemisch zu beiden Messzeitpunkten bestätigt werden. Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, dass nach Thoraxtrauma und Sepsis zum 12 h Zeitpunkt erhöhte RIPK1 mRNA Werte in der Lunge vorliegen.

Wie bereits vorbeschrieben führten Thoraxtrauma und Sepsis zu einer Erhöhung der Inflammation und Apoptose beim Vergleich der non-targeting Traumagruppe mit deren Kontrolltieren. Die Applikation von RIPK1 siRNA führte zu einer lokalen und systemischen Suppression der Zyto- und Chemokinausschüttung in Lungengewebe, Blutplasma und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit, gemessen

an den Parametern G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), IL(Interleukin)-1ß, IL-6, IL-10, TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α), Fas (=Cluster of Differentiation 95), FasL (Fas-Ligand), MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), KC (Keratinocyte-derived Chemokine) und MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2). Die Effekte auf die Zytokine korrelierten dabei nicht mit der Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe, welche unbeeinträchtigt blieb. Dabei waren keine protektiven Effekte des RIPK1 Silencings auf die Apoptose (Caspase-3 Western Blotting und TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Färbung von Lungengewebsschnitten) erkennbar. Die Schädigung der alveolokapillären Barriere nach Double-Hit blieb durch RIPK1 siRNA unbeeinflusst, gemessen an dem Einstrom von Protein in den alveolären Raum und der Histologie. Gleichzeitig zeigte sich in den Zellversuchen, dass murine Epithelzellen und Makrophagen nach Stimulation mit TNF-α anders als L929 Fibroblasten als apoptotische Zelllinie reagierten und die spezifische Inhibition von Necroptose mittels Necrostatin-1 ohne Einfluss auf den Zelltod blieb. In einem weiteren Zellmodell konnte gezeigt werden, dass RIPK1 Silencing keinen Einfluss auf die TNF-α-induzierte Caspase-3/7-Aktivitätserhöhung und die Zytokinproduktion in murinen Lungenepithelzellen hat.

Dies ist die erste Studie, welche zeigt, dass RIPK1 in Alveolarepithelzellen pathogenetisch in die Entstehung der Inflammation während der traumainduzierten septischen Lungenschädigung involviert ist. Die Tatsache, dass eine Verminderung der Inflammation nicht in einer Besserung der Lungenschädigung resultierte, spricht in Gesamtschau dieser und anderer Studien dafür, dass Apoptose der prädominante Schädigungsmechanismus in diesem Double-Hit Modell der akuten Lungenschädigung darstellen könnte.

6. Literaturverzeichnis

[1] Allan, G., Bhattacherjee, P., Brook, C. D., Read, N. G., Parke, A. J. Myeloperoxidase activity as a quantitative marker of polymorphonuclear leukocyte accumulation into an experimental myocardial infarct--the effect of ibuprofen on infarct size and polymorphonuclear leukocyte accumulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7, 1154–1160 (1985).

[2] Bachofen, M. and Weibel, E. R. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin. Chest Med.* 3, 35–56 (1982).

[3] Baichwal, V. R. and Baeuerle, P. A. Activate NF-kappa B or die? *Curr. Biol.* 7, R94-6 (1997).

[4] Bem, R. A., Farnand, A. W., Wong, V., Koski, A., Rosenfeld, M. E., van Rooijen, N., Frevert, C. W., Martin, T. R., Matute-Bello, G. Depletion of resident alveolar macrophages does not prevent Fas-mediated lung injury in mice. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 295, L314–25 (2008).

[5] Bernard, G. R., Artigas, A., Brigham, K. L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., Lamy, M., Legall, J. R., Morris, A., Spragg, R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149, 818–824 (1994).

[6] Bertolini, G., Lewandowski, K., Bion, J., Romand, J.-A., Villar, J., Thorsteinsson, A., Damas, P., Armaganidis, A., Lemaire, F., Minelli, C., Brun-Buisson, C., Brazzi, L., Pimentel, J. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. *Intensive Care Medicine* 30, 51–61 (2004).

[7] Boldin, M. P., Mett, I. L., Varfolomeev, E. E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J. H., Wallach, D. Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J. Biol. Chem.* 270, 387–391 (1995).

[8] Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., Sibbald, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644–1655 (1992).

[9] Cauwels, A., Janssen, B., Waeytens, A., Cuvelier, C., Brouckaert, P. Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor–induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat Immunol* 4, 387–393 (2003).

[10] Chaudry, I. H., Hirasawa, H., Baue, A. E. Impairment of reticuloendothelial system function with sepsis and its improvement with ATP-MgCl2 plus glucose administration. *Adv Shock Res* 2, 153–162 (1979).

[11] Chen, T.-Y., Chi, K.-H., Wang, J.-S., Chien, C.-L., Lin, W.-W. Reactive oxygen species are involved in FasL-induced caspase-independent cell death and inflammatory responses. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 643–655 (2009).

[12] Cho, B. B. and Toledo-Pereyra, L. H. Caspase-Independent Programmed Cell Death Following Ischemic Stroke. *J Invest Surg* 21, 141–147 (2008).

[13] Collins, F. S. 2012. *ImageJ*. http://rsbweb.nih.gov/ij/. Accessed 31 May 2014.
[14] Declercq, W., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. RIP Kinases at the Crossroads of Cell Death and Survival. *Cell* 138, 229–232 (2009).
[15] Degterev, A., Hitomi, J., Germscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G. D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S. M., Gerber, S. A., Lugovskoy, A., Yuan, J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 4, 313–321 (2008).
[16] Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., Yuan, J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112–119 (2005).
[17] Dewar, D., Moore, F. A., Moore, E. E., Balogh, Z. Postinjury multiple organ failure. *Injury* 40, 912–918 (2009).
[18] Duprez, L., Takahashi, N., Van Hauwermeiren, F., Vandendriessche, B., Goossens, V., Vanden Berghe, T., Declercq, W., Libert, C., Cauwels, A., Vandenabeele, P. RIP Kinase-Dependent Necrosis Drives Lethal Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Immunity* 35, 908–918 (2011).
[19] Ertel, W., Keel, M., Buergi, U., Hartung, T., Imhof, H. G., Trentz, O. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits neutrophil apoptosis at the local site after severe head and thoracic injury. *J Trauma* 46, 784–792 (1999).
[20] Farnand, A. W., Eastman, A. J., Herrero, R., Hanson, J. F., Mongovin, S., Altemeier, W. A., Matute-Bello, G. Fas Activation in Alveolar Epithelial Cells Induces KC (CXCL1) Release by a MyD88-Dependent Mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 650–658 (2011).
[21] Festjens, N., Vanden Berghe, T., Cornelis, S., Vandenabeele, P. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ* 14, 400–410 (2007).
[22] François, M., Le Cabec, V., Dupont, M. A., Sansonetti, P. J., Maridonneau-Parini, I. Induction of necrosis in human neutrophils by Shigella flexneri requires type III secretion, IpaB and IpaC invasins, and actin polymerization. *Infect. Immun.* 68, 1289–1296 (2000).
[23] Gaillard, M., Hervé, C., Mandin, L., Raynaud, P. Mortality prognostic factors in chest injury. *J Trauma* 30, 93–96 (1990).
[24] Gebhard, F., Pfetsch, H., Steinbach, G., Strecker, W., Kinzl, L., Brückner, U. B. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg* 135, 291–295 (2000).
[25] Gennari, R., Alexander, J. W., Pyles, T., Hartmann, S., Ogle, C. K. Effects of antimurine interleukin-6 on bacterial translocation during gut-derived sepsis. *Arch Surg* 129, 1191–1197 (1994).
[26] 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).

[27] He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., Wang, X. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF-α. *Cell* 137, 1100–1111 (2009).

[28] Heidel, J. D., Hu, S., Liu, X. F., Triche, T. J., Davis, M. E. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* 22, 1579–1582 (2004).

[29] Herridge, M. S., Cheung, A. M., Tansey, C. M., Matte-Martyn, A., Diaz-Granados, N., Al-Saidi, F., Cooper, A. B., Guest, C. B., Mazer, C. D., Mehta, S., Stewart, T. E., Barr, A., Cook, D., Slutsky, A. S. One-Year Outcomes in Survivors of the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 348, 683–693 (2003).

[30] Hiramatsu, M., Hotchkiss, R. S., Karl, I. E., Buchman, T. G. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock* 7, 247–253 (1997).

[31] Hotchkiss, R. S., Chang, K. C., Grayson, M. H., Tinsley, K. W., Dunne, B. S., Davis, C. G., Osborne, D. F., Karl, I. E. Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6724–6729 (2003).

[32] Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., Swanson, P. E. Cell Death. *N Engl J Med* 361, 1570–1583 (2009).

[33] Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Knudson, C. M., Chang, K. C., Cobb, J. P., Osborne, D. F., Zollner, K. M., Buchman, T. G., Korsmeyer, S. J., Karl, I. E. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J. Immunol.* 162, 4148–4156 (1999).

[34] Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E., Chang, K. C., Cobb, J. P., Buchman, T. G., Korsmeyer, S. J., Karl, I. E. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14541–14546 (1999).

[35] Inthorn, D. and Huf, R. Das Thoraxtrauma beim Mehrfachverletzten. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 27, 498–501 (1992).

[36] Jagtap, P. G., Degterev, A., Choi, S., Keys, H., Yuan, J., Cuny, G. D. Structure-activity relationship study of tricyclic necroptosis inhibitors. *J. Med. Chem.* 50, 1886–1895 (2007).

[37] Kawasaki, M., Kuwano, K., Hagimoto, N., Matsuba, T., Kunitake, R., Tanaka, T., Maeyama, T., Hara, N. Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. *Am. J. Pathol.* 157, 597–603 (2000).

[38] Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., Leder, P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* 8, 297–303 (1998).

[39] Kim, J. W., Choi, E. J., Joe, C. O. Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by pro-apoptotic C-terminal fragment of RIP. *Oncogene* 19, 4491–4499 (2000).

[40] Knöferl, M. W., Liener, U. C., Seitz, D. H., Perl, M., Brückner, U. B., Kinzl, L., Gebhard, F. Cardiopulmonary, Histological, and Inflammatory Alterations After

Lung Contusion in a Novel Mouse Model of Blunt Chest Trauma. *Shock* 19, 519–525 (2003).

[41] Krammer, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789–795 (2000).

[42] Kreuz, S., Siegmund, D., Rumpf, J.-J., Samel, D., Leverkus, M., Janssen, O., Häcker, G., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Scheurich, P., Wajant, H. NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J. Cell Biol.* 166, 369–380 (2004).

[43] Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3–11 (2008).

[44] Labbe, K., Danialou, G., Gvozdic, D., Demoule, A., Divangahi, M., Boyd, J. H., Petrof, B. J. Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 prevents diaphragmatic inflammation and maintains contractile function during endotoxemia. *Crit Care* 14, R187 (Online Zeitschriftenaufsatz) (2010).

[45] László, B. *BiSearch: Primer Design and Search Tool*. http://bisearch.enzim.hu/ . Accessed 31 May 2014.

[46] Lee, T. H., Shank, J., Cusson, N., Kelliher, M. A. The Kinase Activity of Rip1 Is Not Required for Tumor Necrosis Factor- -induced I B Kinase or p38 MAP Kinase Activation or for the Ubiquitination of Rip1 by Traf2. *Journal of Biological Chemistry* 279, 33185–33191 (2004).

[47] Legler, D. F., Micheau, O., Doucey, M.-A., Tschopp, J., Bron, C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity* 18, 655–664 (2003).

[48] Libert, C., Vink, A., Coulie, P., Brouckaert, P., Everaerdt, B., van Snick, J., Fiers, W. Limited involvement of interleukin-6 in the pathogenesis of lethal septic shock as revealed by the effect of monoclonal antibodies against interleukin-6 or its receptor in various murine models. *Eur. J. Immunol.* 22, 2625–2630 (1992).

[49] Liener, U. C., Knöferl, M. W., Sträter, J., Barth, Thomas F. E., Pauser, E.-M., Nüssler, A. K., Kinzl, L., Brückner, U. B., Gebhard, F. Induction of Apoptosis Following Blunt Chest Trauma. *Shock* 20, 511–516 (2003).

[50] Liener, U. C., Perl, M., Huber-Lang, M. S., Seitz, D. H., Brückner, U. B., Gebhard, F., Knöferl, M. W. Is the function of alveolar macrophages altered following blunt chest trauma? *Langenbecks Arch Surg* 396, 251–259 (2011).

[51] Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., Liu, Z. G. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.* 13, 2514–2526 (1999).

[52] Linkermann, A., Bräsen, J. H., Himmerkus, N., Liu, S., Huber, T. B., Kunzendorf, U., Krautwald, S. Rip1 (Receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 81, 751–761 (2012).

[53] Linkermann, A., Bräsen, J. H., Zen, F. de, Weinlich, R., Schwendener, R. A., Green, D. R., Kunzendorf, U., Krautwald, S. Dichotomy between RIP1- and RIP3-mediated necroptosis in tumor necrosis factor-α-induced shock. *Mol. Med.* 18, 577–586 (2012).

[54] Lomas-Neira, J. Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 290, L51–58 (2005).

[55] Lomas-Neira, J., Perl, M., Venet, F., Chung, C.-S., Ayala, A. The role and source of tumor necrosis factor-α in hemorrhage-induced priming for septic lung injury. *Shock* 37, 611–620 (2012).

[56] Lomas-Neira, J. L. In vivo gene silencing (with siRNA) of pulmonary expression of MIP-2 versus KC results in divergent effects on hemorrhage-induced, neutrophil-mediated septic acute lung injury. *Journal of Leukocyte Biology* 77, 846–853 (2005).

[57] Ma, Y., Temkin, V., Liu, H., Pope, R. M. NF-kappaB protects macrophages from lipopolysaccharide-induced cell death: the role of caspase 8 and receptor-interacting protein. *J. Biol. Chem.* 280, 41827–41834 (2005).

[58] Manley, M. O., O'Riordan, M. A., Levine, A. D., Latifi, S. Q. Interleukin 10 extends the effectiveness of standard therapy during late sepsis with serum interleukin 6 levels predicting outcome. *Shock* 23, 521–526 (2005).

[59] Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S., Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348, 1546–1554 (2003).

[60] Martin, T. R. Apoptosis and Epithelial Injury in the Lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2, 214–220 (2005).

[61] Matsuda, N., Yamamoto, S., Takano, K.-i., Kageyama, S.-i., Kurobe, Y., Yoshihara, Y., Takano, Y., Hattori, Y. Silencing of Fas-associated Death Domain Protects Mice from Septic Lung Inflammation and Apoptosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 806–815 (2009).

[62] Matthay, M. A., Zimmerman, G. A., Esmon, C., Bhattacharya, J., Coller, B., Doerschuk, C. M., Floros, J., Gimbrone, M. A., Hoffman, E., Hubmayr, R. D., Leppert, M., Matalon, S., Munford, R., Parsons, P., Slutsky, A. S., Tracey, K. J., Ward, P., Gail, D. B., Harabin, A. L. Future Research Directions in Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1027–1035 (2003).

[63] Matute-Bello, G., Liles, W. C., Steinberg, K. P., Kiener, P. A., Mongovin, S., Chi, E. Y., Jonas, M., Martin, T. R. Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *J. Immunol.* 163, 2217–2225 (1999).

[64] Maus, U., Huwe, J., Maus, R., Seeger, W., Lohmeyer, J. Alveolar JE/MCP-1 and endotoxin synergize to provoke lung cytokine upregulation, sequential neutrophil and monocyte influx, and vascular leakage in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 406–411 (2001).

[65] McNamara, C. R., Ahuja, R., Osafo-Addo, A. D., Barrows, D., Kettenbach, A., Skidan, I., Teng, X., Cuny, G. D., Gerber, S., Degterev, A. Akt Regulates

TNFα synthesis downstream of RIP1 kinase activation during necroptosis. *PloS one* 8, e56576 (2013).

[66] McNeal, S. I., LeGolvan, M. P., Chung, C.-S., Ayala, A. The Dual Functions of Receptor Interacting Protein 1 in Fas-Induced Hepatocyte Death During Sepsis. *Shock* 35, 499–505 (2011).

[67] Meduri, G. U., Kohler, G., Headley, S., Tolley, E., Stentz, F., Postlethwaite, A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest* 108, 1303–1314 (1995).

[68] Messer, M. P., Kellermann, P., Weber, S. J., Hohmann, C., Denk, S., Klohs, B., Schultze, A., Braumüller, S., Huber-Lang, M. S., Perl, M. Silencing of fas, fas-associated via death domain, or caspase 3 differentially affects lung inflammation, apoptosis, and development of trauma-induced septic acute lung injury. *Shock* 39, 19–27 (2013).

[69] Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., Tschopp, J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3–induced NF-κB activation. *Nat Immunol* 5, 503–507 (2004).

[70] Meylan, E. and Tschopp, J. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 151–159 (2005).

[71] Micheau, O. and Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190 (2003).

[72] Moulin, M., Anderton, H., Voss, A. K., Thomas, T., Wong, W. W.-L., Bankovacki, A., Feltham, R., Chau, D., Cook, W. D., Silke, J., Vaux, D. L. IAPs limit activation of RIP kinases by TNF receptor 1 during development. *The EMBO journal* 31, 1679–1691 (2012).

[73] Nguyen, Thi Loan Anh, Vieira-Silva, S., Liston, A., Raes, J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms* 8, 1–16 (2015).

[74] Northington, F. J., Chavez-Valdez, R., Graham, E. M., Razdan, S., Gauda, E. B., Martin, L. J. Necrostatin decreases oxidative damage, inflammation, and injury after neonatal HI. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 178–189 (2010).

[75] Novina, C. D. and Sharp, P. A. The RNAi revolution. *Nature* 430, 161–164 (2004).

[76] Park, H. H., Lo, Y.-C., Lin, S.-C., Wang, L., Yang, J. K., Wu, H. The Death Domain Superfamily in Intracellular Signaling of Apoptosis and Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 561–586 (2007).

[77] Park, S., Hatanpaa, K. J., Xie, Y., Mickey, B. E., Madden, C. J., Raisanen, J. M., Ramnarain, D. B., Xiao, G., Saha, D., Boothman, D. A., Zhao, D., Bachoo, R. M., Pieper, R. O., Habib, A. A. The receptor interacting protein 1 inhibits p53 induction through NF-kappaB activation and confers a worse prognosis in glioblastoma. *Cancer Res.* 69, 2809–2816 (2009).

[78] Park, W. Y., Goodman, R. B., Steinberg, K. P., Ruzinski, J. T., Radella, F., Park, D. R., Pugin, J., Skerrett, S. J., Hudson, L. D., Martin, T. R. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 1896–1903 (2001).

[79] Perl, M., Chung, C.-S., Lomas-Neira, J., Rachel, T.-M., Biffl, W. L., Cioffi, W. G., Ayala, A. Silencing of Fas, but not caspase-8, in lung epithelial cells ameliorates pulmonary apoptosis, inflammation, and neutrophil influx after hemorrhagic shock and sepsis. *Am. J. Pathol.* 167, 1545–1559 (2005).

[80] Perl, M., Chung, C.-S., Perl, U., Biffl, W. L., Cioffi, W. G., Ayala, A. Beneficial Versus Detrimental Effects of Neutrophils Are Determined by the Nature of the Insult. *Journal of the American College of Surgeons* 204, 840–852 (2007).

[81] Perl, M., Chung, C.-S., Perl, U., Lomas-Neira, J., Paepe, M. de, Cioffi, W. G., Ayala, A. Fas-induced pulmonary apoptosis and inflammation during indirect acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 591–601 (2007).

[82] Perl, M., Chung, C.-S., Perl, U., Thakkar, R., Lomas-Neira, J., Ayala, A. Therapeutic accessibility of caspase-mediated cell death as a key pathomechanism in indirect acute lung injury*. *Critical Care Medicine* 38, 1179–1186 (2010).

[83] Perl, M., Gebhard, F., Braumüller, S., Tauchmann, B., Brückner, U. B., Kinzl, L., Knöferl, M. W. The pulmonary and hepatic immune microenvironment and its contribution to the early systemic inflammation following blunt chest trauma. *Critical Care Medicine* 34, 1152–1159 (2006).

[84] Perl, M., Gebhard, F., Brückner, U. B., Ayala, A., Braumüller, S., Büttner, C., Kinzl, L., Knöferl, M. W. Pulmonary contusion causes impairment of macrophage and lymphocyte immune functions and increases mortality associated with a subsequent septic challenge*. *Critical Care Medicine* 33, 1351–1358 (2005).

[85] Perl, M., Hohmann, C., Denk, S., Kellermann, P., Lu, D., Braumüller, S., Bachem, M. G., Thomas, J., Knöferl, M. W., Ayala, A., Gebhard, F., Huber-Lang, M. S. Role of Activated Neutrophils in Chest Trauma–Induced Septic Acute Lung Injury. *Shock* 38, 98–106 (2012).

[86] Perl, M., Kieninger, M., Huber-Lang, M. S., Gross, H.-J., Bachem, M. G., Braumüller, S., Gebhard, F., Ayala, A., Knöferl, M. W. Divergent Effects of Activated Neutrophils on Inflammation, Kupffer Cell/Splenocyte Activation, and Lung Injury Following Blunt Chest Trauma. *Shock* 37, 210–218 (2012).

[87] Perl, M., Lomas-Neira, J., Chung, C.-S., Ayala, A. Epithelial cell apoptosis and neutrophil recruitment in acute lung injury-a unifying hypothesis? What we have learned from small interfering RNAs. *Mol. Med.* 14, 465–475 (2008).

[88] Perl, M., Lomas-Neira, J., Venet, F., Chung, C.-S., Ayala, A. Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. *Expert Review of Respiratory Medicine* 5, 115–126 (2011).

[89] Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45 (Online Zeitschriftenaufsatz) (2001).

[90] Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36 (Online Zeitschriftenaufsatz) (2002).

[91] Proudfoot, A. G., McAuley, D. F., Griffiths, M. J. D., Hind, M. Human models of acute lung injury. *Disease Models & Mechanisms* 4, 145–153 (2011).

[92] Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, Ronald H Lekanne, Moorman, Antoon F M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339, 62–66 (2003).

[93] Rettig, G. R. and Behlke, M. A. Progress toward in vivo use of siRNAs-II. *Mol. Ther.* 20, 483–512 (2012).

[94] Rodrigue-Gervais, I. G., Labbé, K., Dagenais, M., Dupaul-Chicoine, J., Champagne, C., Morizot, A., Skeldon, A., Brincks, E. L., Vidal, S. M., Griffith, T. S., Saleh, M. Cellular inhibitor of apoptosis protein cIAP2 protects against pulmonary tissue necrosis during influenza virus infection to promote host survival. *Cell Host & Microbe* 15, 23–35 (2014).

[95] Rosenbaum, D. M., Degterev, A., David, J., Rosenbaum, P. S., Roth, S., Grotta, J. C., Cuny, G. D., Yuan, J., Savitz, S. I. Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia-reperfusion injury model. *J. Neurosci. Res.*, 1569–1576 (2009).

[96] Rozen, S. and Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386 (2000).

[97] Rubenfeld, G. D., Caldwell, E., Peabody, E., Weaver, J., Martin, D. P., Neff, M., Stern, E. J., Hudson, L. D. Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury. *N Engl J Med* 353, 1685–1693 (2005).

[98] Seidman, C. E. *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*. http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Accessed 31 May 2014.

[99] Seitz, D. H., Niesler, U., Palmer, A., Sulger, M., Braumüller, S. T., Perl, M., Gebhard, F., Knöferl, M. W. Blunt chest trauma induces mediator-dependent monocyte migration to the lung. *Critical Care Medicine* 38, 1852–1859 (2010).

[100] Seitz, D. H., Perl, M., Liener, U. C., Tauchmann, B., Braumüller, S. T., Brückner, U. B., Gebhard, F., Knöferl, M. W. Inflammatory Alterations in a Novel Combination Model of Blunt Chest Trauma and Hemorrhagic Shock. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 70, 189–196 (2011).

[101] Seitz, D. H., Perl, M., Mangold, S., Neddermann, A., Braumüller, S. T., Zhou, S., Bachem, M. G., Huber-Lang, M. S., Knöferl, M. W. Pulmonary contusion induces alveolar type 2 epithelial cell apoptosis. *Shock* 30, 537–544 (2008).

[102] Smith, C., Davidson, S. M., Lim, S. Y., Simpkin, J. C., Hothersall, J. S., Yellon, D. M. Necrostatin: A Potentially Novel Cardioprotective Agent? *Cardiovasc Drugs Ther* 21, 227–233 (2007).

[103] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85 (1985).

[104] Sookhai, S., Wang, J. J., McCourt, M., Kirwan, W., Bouchier-Hayes, D., Redmond, P. A novel therapeutic strategy for attenuating neutrophil-mediated lung injury in vivo. *Ann. Surg.* 235, 285–291 (2002).

[105] Stanger, B. Z. RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81, 513–523 (1995).

[106] Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4, 3–4 (2012).

[107] Stratton, M. *BLAST Search*. http://www.ensembl.org/Multi/blastview. Accessed 31 May 2014.

[108] Sun, X., Yin, J., Starovasnik, M. A., Fairbrother, W. J., Dixit, V. M. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *J. Biol. Chem.* 277, 9505–9511 (2002).

[109] Takaesu, G., Surabhi, R. M., Park, K.-J., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Gaynor, R. B. TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J. Mol. Biol.* 326, 105–115 (2003).

[110] Talbott, S. J., Luanpitpong, S., Stehlik, C., Azad, N., Iyer, Anand Krishnan V, Wang, L., Rojanasakul, Y. S-nitrosylation of FLICE inhibitory protein determines its interaction with RIP1 and activation of NF-κB. *Cell Cycle* 13, Epub ahead of print (2014).

[111] Tchikov, V., Bertsch, U., Fritsch, J., Edelmann, B., Schütze, S. Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. *European Journal of Cell Biology* 90, 467–475 (2011).

[112] Thomas, M., Lu, J. J., Chen, J., Klibanov, A. M. Non-viral siRNA delivery to the lung. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 124–133 (2007).

[113] Thome, M. and Tschopp, J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 50–58 (2001).

[114] Ting, A. T., Pimentel-Muiños, F. X., Seed, B. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J.* 15, 6189–6196 (1996).

[115] Tusnády, G. E., Simon, I., Váradi, A., Arányi, T. BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Res.* 33, e9 (Online Zeitschriftenaufsatz) (2005).

[116] Uhal, B. D., Rayford, H., Zhuang, J., Li, X., Laukka, J., Soledad-Conrad, V. Apoptosis-dependent acute lung injury and repair after intratracheal instillation of noradrenaline in rats. *Exp. Physiol.* 88, 269–275 (2003).

[117] Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115 (2012).

[118] Upton, J. W., Kaiser, W. J., Mocarski, E. S. Virus Inhibition of RIP3-Dependent Necrosis. *Cell Host & Microbe* 7, 302–313 (2010).

[119] Vaishnaw, A. K., Gollob, J., Gamba-Vitalo, C., Hutabarat, R., Sah, D., Meyers, R., Fougerolles, T. de, Maraganore, J. A status report on RNAi therapeutics. *Silence* 1, 14 (Online Zeitschriftenaufsatz) (2010).

[120] Vanden Berghe, T., Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger, Y., Krysko, D. V., Takahashi, N., Vandenabeele, P. Determination of apoptotic and

necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods (San Diego, Calif.)* 61, 117–129 (2013).

[121] Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 700–714 (2010).

[122] Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., Vandenabeele, P. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 187, 1477–1485 (1998).

[123] Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M, Declercq, W., Fiers, W., Vandenabeele, P. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J. Exp. Med.* 188, 919–930 (1998).

[124] Vögtle, F.-N., Prinz, C., Kellermann, J., Lottspeich, F., Pfanner, N., Meisinger, C. Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. *Molecular Biology of the Cell* 22, 2135–2143 (2011).

[125] Vyas, D., Javadi, P., DiPasco, P. J., Buchman, T. G., Hotchkiss, R. S., Coopersmith, C. M. Early antibiotic administration but not antibody therapy directed against IL-6 improves survival in septic mice predicted to die on basis of high IL-6 levels. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289, R1048–53 (2005).

[126] Ware, L. B. and Matthay, M. A. The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 342, 1334–1349 (2000).

[127] Weckbach, S., Hohmann, C., Denk, S., Kellermann, P., Huber-Lang, M. S., Baumann, B., Wirth, T., Gebhard, F., Bachem, M., Perl, M. Apoptotic and inflammatory signaling via Fas and tumor necrosis factor receptor I contribute to the development of chest trauma-induced septic acute lung injury. *The journal of trauma and acute care surgery* 74, 792–800 (2013).

[128] Weng, D., Marty-Roix, R., Ganesan, S., Proulx, M. K., Vladimer, G. I., Kaiser, W. J., Mocarski, E. S., Pouliot, K., Chan, F. K.-M., Kelliher, M. A., Harris, P. A., Bertin, J., Gough, P. J., Shayakhmetov, D. M., Goguen, J. D., Fitzgerald, K. A., Silverman, N., Lien, E. Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 7391–7396 (2014).

[129] Wesche-Soldato, D. E. In vivo delivery of caspase-8 or Fas siRNA improves the survival of septic mice. *Blood* 106, 2295–2301 (2005).

[130] Xu, X., Chua, K.-W., Chua, C. C., Liu, C.-F., Hamdy, R. C., Chua, Balvin H L. Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *Brain Res.* 1355, 189–194 (2010).

[131] You, Z., Savitz, S. I., Yang, J., Degterev, A., Yuan, J., Cuny, G. D., Moskowitz, M. A., Whalen, M. J. Necrostatin-1 reduces histopathology and improves functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1564–1573 (2008).

[132] Zhang, D.-W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.-J., Lin, S.-C., Dong, M.-Q., Han, J. RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. *Science* 325, 332–336 (2009).

[133] Zhang, D.-W., Zheng, M., Zhao, J., Li, Y.-Y., Huang, Z., Li, Z., Han, J. Multiple death pathways in TNF-treated fibroblasts: RIP3- and RIP1-dependent and independent routes. *Cell Res* 21, 368–371 (2011).

[134] Zhang, S. Q., Kovalenko, A., Cantarella, G., Wallach, D. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* 12, 301–311 (2000).

[135] Zhuang, J.-J., Li, X.-P., Uhal, B. D., Yian, K. R. Apoptosis-dependent acute pulmonary injury after intratracheal instillation of angiotensin II. *Sheng Li Xue Bao* 60, 715–722 (2008).

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.