

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

Einfluss des Fas-Rezeptors
auf die Pathogenese von Inflammation und Apoptose
eines Thoraxtrauma-induzierten
septischen akuten Lungenschadens

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

Vorgelegt von
Philipp Kellermann,
geboren in Heilbronn
2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Mario Perl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 14.02.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Apoptose	1
1.2 Definition, Ätiologie und Epidemiologie des Acute Respiratory Distress Syndromes (ARDS).....	2
1.3 Pathophysiologie des ARDS.....	4
1.4 Die Neutrophilenhypothese	5
1.5 Die Epithelzellhypothese	5
1.6 Die Rolle des Fas-Signalweges auf die Apoptose	6
1.7 Die Rolle des Fas-Signalweges bei Inflammation.....	7
1.8 Zielsetzung der Studie	7
2 Material & Methoden	9
2.1 Materialien	9
2.1.1 Geräte und Software	9
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien	10
2.1.3 Antikörper.....	11
2.1.4 Puffer und Lösungen	12
2.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.6 Kits	15
2.1.7 Mausstämme	16
2.2 Methoden	16
2.2.1 Tierversuch	16
2.2.2 Probenaufbereitung.....	18
2.2.3 Proteinbestimmung.....	19
2.2.4 Western-Blot Analyse.....	20
2.2.5 ELISA	21
2.2.6 Multiplex	21
2.2.7 Myeloperoxidase Aktivität	22
2.2.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	23
2.2.9 TUNEL Färbung.....	23
2.2.10 Mikroskopie.....	23
2.2.11 Statistik	24
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Zytokine und Chemokine im Plasma.....	25
3.2 Zytokine und Chemokine in der Lunge	28
3.3 Zytokine und Chemokine in der Bronchoalveolären Lavage	32
3.4 Myeloperoxidase-Aktivität im Lungengewebe.....	35
3.5 Permeabilitätsstörung der alveolo-kapillären Barriere	36

3.6	Apoptose in der Lunge.....	36
3.7	Lungenhistologie	39
4	Diskussion	41
4.1	Systemische und lokale Immunantwort.....	41
4.2	Pulmonale Neutrophilen-Infiltration.....	45
4.3	Apoptose	46
4.4	Störung der Alveolo-kapillären Barriere	48
4.5	Histologie.....	50
4.6	Schlussfolgerung.....	51
5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis	55
	Danksagung	68
	Lebenslauf	69

Abkürzungsverzeichnis

ALI	Acute Lung Injury (engl.)
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser
Aquadest	Einfach destilliertes Wasser
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome (engl.)
BALF/BAL	Bronchoalveolar lavage fluid (engl.)
BCA	Bicinchoninic acid (engl.)
CAD	Caspase-aktivierten DNase
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CLP	Caecu mligatur und Punktion
cFLIP	Cellular FLICE[alias Caspase-8]-like inhibitory protein
DISC	Death-inducing signal complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FADD	Fas associated death domain (engl.)
Fas	Fas-Rezeptor, CD95 (cluster of differentiation, engl.)
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetal Calfserum (engl.)
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor (engl.)
GM-CSF	Granulocyte/Monocyte Colony Stimulating Factor (engl.)
IDV	Integrated density value (engl.)
IL	Interleukin
KC	Keratinocyte-derived chemokine (engl.)
KPP	Kaliumphosphatpuffer
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein (engl.)
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2 (engl.)
MMP	Matrix-Metallo-Protease
NF-κB	Nuclear Factor kappa B (engl.)
PBS	Phosphate Buffered Saline (engl.)

PBST	PBS mit Tween
PEEP	Positiver endexpiratorischem Druck
PMN	Polymorphnuclear Neutrophil (engl.)
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
RIP	Rezeptor-interagierende Serin/Threonine Kinase 1
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay (engl.)
Rpm	Revolutions per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	Small interfering Ribonucleid acid (engl.)
TBS	Tris Buffered Saline (engl.)
TNF	Tumor Necrosis Factor (engl.)
TRADD	Tumornekrosefaktor Rezeptor Todes-Domäne
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand-Rezeptor
TUNEL	TdTmediated dUTP-biotin nick end labeling
TxT	Thoraxtrauma

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgendem Fachartikel veröffentlicht:

Weckbach S, Hohmann C, Denk S, Kellermann P, Huber-Lang MS, 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. J Trauma Acute Care Surg 74: 792-800 (2013).

1 Einleitung

1.1 Apoptose

Der Begriff Apoptose beschreibt den Vorgang des programmierten Zelltods, der durch die Zelle selbst induziert und kontrolliert wird. Er wurde erstmals 1972 im Zusammenhang mit der Zellbiologie verwendet, um die Morphologie einer sterbenden Zelle zu beschreiben, die sich deutlich von der einer nekrotischen Zelle unterscheidet [70]. Die Apoptose ist von entscheidender physiologischer Relevanz, da sie für die Beseitigung beschädigter, überflüssiger oder potentiell gefährlicher Zellen unabdingbar ist.

Sie kann in einen intrinsischen und extrinsischen Weg unterteilt werden. Der intrinsische oder auch mitochondrialer Weg wird durch eine Vielzahl an Stressoren, darunter oxidativer Stress oder zytotoxische Substanzen ausgelöst. Diese induzieren die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien, welches über die Bindung an Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) zu einer Konformationsänderung führt. Dadurch wird die Proteinbindende Domäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) von Apaf-1 zugänglich für Bindung von Procaspase-9, was die autokatalytische Aktivierung der Caspase-9 bewirkt [27,57]. Dieser Komplex wird als Apoptosom bezeichnet und aktiviert die Procaspasen der proapoptotischen Caspasenkaskade, insbesondere Caspase-3. Diese wird zusammen mit Caspase-6 und -7 zu den Effektorcaspasen gezählt, da sie über die Spaltung abhängiger Substrate zur Zerstörung der Zelle führen. So triggert Caspase-3 die Aktivierung der Caspase-aktivierten DNase (CAD), welche die Fragmentation der nukleären DNA [133] und die Kondensation des Zellkernchromatins katalysiert. Dadurch fragmentiert der Zellkern und es kommt zur Ausbildung sogenannter apoptotischer Körperchen. In der Zellmembran wird Phosphatidylserin nach außen verlagert, was von Phagozyten erkannt wird, welche schließlich die betroffenen Zellen phagozytieren [35,36].

Der extrinsische Weg wird rezeptorvermittelt, d.h. auf der Zelle durch die Bindung an membranständige Rezeptoren eingeleitet. Zu den wichtigsten Vertretern gehören die Rezeptoren der TNF (Tumornekrosefaktor) Superfamilie, darunter der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1), Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNFR2), Fas-Rezeptor und TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand-Rezeptor) [84]. Nach Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor kommt es zur seiner Oligomerisierung und Rekrutierung von Adaptermolekülen. Im Falle des Fas-Rezeptors ist dies die Fas-associated death domain

(FADD). Beim TNFR1 ist es die Tumornekrosefaktor Rezeptor Todes-Domäne (TRADD) zusammen mit rekrutierten FADD und Rezeptor-interagierende Serin/Threonine Kinase 1 (RIP) [47,64,145]. Über eine Dimerisation der Todesdomäne von FADD und der Assoziation von Procaspase-8 wird der sogenannte Death-inducing signal complex (DISC) gebildet. Im DISC findet die Umwandlung der Procaspase-8 in ihre aktive Form statt [73]: Diese spaltet ihr Proenzym ab und liegt anschließend als p10 und p20 Untereinheit vor. Jeweils zweier dieser Untereinheiten bilden die aktive Form der Caspase-8. Anschließend aktiviert diese die Procaspasen des apoptotischen Signalweges (u.a. Caspase-3, -6, -7) und leitet analog zur Caspase-9 im intrinsischen Weg die gemeinsame Endstrecke ein. Dies geschieht über die Aktivierung von Bid, einem Protein der Bcl-2-Familie in tBid. Die aktive Form vermittelt die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Cytochrom C führt wiederum zur Aktivierung von Caspase-9 (s.o.). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Apoptose eine wichtige Rolle bei der Entstehung vieler Krankheitsbilder wie Infektionen, Sepsis und Autoimmunerkrankungen spielt. Darüber hinaus wird sie als zentraler pathophysiologischer Mechanismus des Acute respiratory distress syndrome (ARDS) angesehen.

1.2 Definition, Ätiologie und Epidemiologie des Acute Respiratory Distress Syndromes (ARDS)

1967 beschrieben Ashbaugh et al. in der Fachzeitschrift „The Lancet“ bei einem Patientenkollektiv von 12 Personen erstmals das Erscheinungsbild des Acute Respiratory Distress Syndromes (ARDS). Das Krankheitsbild zeichnete sich durch Tachypnoe, Hypoxie, eine verminderte Lungencompliance und durch im Röntgenbild sichtbare bilaterale diffuse Infiltrate der Lunge aus [6]. Diese Erstbeschreibung prägte fortan den Begriff „Acute Respiratory Distress in Adults“. Auf der „American European Consensus Conference on ARDS“ wurde dieser Begriff erweitert und in seiner klinischen Ausprägung weiter charakterisiert [14]. Bilaterale diffuse Infiltrate im Röntgenthorax, ein pulmonalarterieller Druck ≤ 18 mmHg und ein Quotient von arteriellem Sauerstoffpartialdruck (PaO_2)/inspiratorischer Sauerstoffkonzentration (FiO_2) ≤ 200 mmHg definierten das Vorliegen eines ARDS und in seiner milderen Verlaufsform ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mmHg) das „Acute Lung Injury“ (ALI). Seit 2012 wurde die Unterscheidung zwischen ALI und ARDS durch die „Berlin Definition“ als überholt erklärt und wird seither in schweres ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq$

100 mmHg bei positivem endexpiratorischem Druck (PEEP) ≥ 5 cm H₂O), moderates (PaO₂/FiO₂ ≤ 200 mmHg, PEEP ≥ 5 cm H₂O) und mildes (PaO₂/FiO₂ ≤ 300 mmHg, PEEP ≥ 5 cmH₂O) ARDS unterteilt [129]. Zur Definition des Krankheitsbildes zählen weiterhin der innerhalb einer Woche stattfindende akute Beginn, bilaterale Verdichtungen in Computertomographie- oder konventionellem Röntgen-Untersuchungen der Lunge und der Ausschluss eines Lungenödems mit kardialer Ursache.

In den USA werden die Inzidenzen eines milden ARDS laut Rubenfeld et al. mit 78,9 auf 100.000 und die des moderaten einschließlich schweren ARDS mit 58,7 auf 100.000 Personenjahre beschrieben. Adjustiert auf die Gesamtbevölkerung der Vereinigten Staaten, werden somit ca. 200.000 Fälle mit ARDS pro Jahr verzeichnet [132]. Dabei zeichnet sich eine altersabhängige Verteilung ab: Während bei den 15 bis 19-jährigen eine Inzidenz von 16 auf 100.000 Personenjahre beschrieben ist, steigt diese bei den 75 bis 84-jährigen auf 306 pro 100.000 Personenjahren an [65,67,132].

In Deutschland liegt die Inzidenz entsprechend bei etwa 40.000 ARDS Fällen pro Jahr. Dabei geht man laut aktueller Daten des ARDS Netzwerks Deutschland von 40-50 Fällen pro Jahr und Klinik aus [18].

Hinsichtlich der zugrunde liegenden Ursachen, die zur Entstehung eines ARDS führen, unterscheidet man ein direktes und indirektes ARDS. Beim direkten ARDS liegt eine direkte Schädigung der Lunge vor, wie z.B. bei Pneumonie, Lungenkontusion, Aspiration und Inhalationstrauma. Diese Form überwiegt mit 55 % das indirekte ARDS, das in 20 % aller Fälle auftritt und dem eine extrapulmonale Schädigung der Lunge zugrunde liegt, wie sie zum z.B. bei Sepsis, Polytrauma, Schock, Verbrennungen, Pankreatitis und Massenbluttransfusionen entsteht. In 21 % der Fälle liegt eine Kombination von indirektem und direktem ARDS vor [19,129]. Dabei stellt die Sepsis den häufigsten zum ARDS führenden Risikofaktor dar und tritt bei direkter von pulmonalen Herden ausgehender Sepsis mit 46 % und bei nicht-pulmonal auftretender Sepsis mit 33 % auf [132]. Die Gesamtletalität bei ARDS liegt je nach Schweregrad und Ursache zwischen 23 % und 59 %. Gleichzeitig birgt die Sepsis als Kofaktor mit ca. 50 % die höchste Letalitätsrate bei ARDS Patienten [19,108,150]. Vor dem Hintergrund des demografischen Wandels wird in den nächsten 20 Jahren eine Verdopplung der Inzidenz prognostiziert [132]. Dabei fehlen bis heute noch adequate Behandlungsstrategien, die am Pathomechanismus des ARDS ansetzen [124]. Stattdessen beschränken sich die bisherigen Therapieoptionen auf eine symptomatische Beatmung mit geringem inspiratorischem Druck bei niedrigem Tidalvolumen in

aufgerichteter Körperlagerung und eine dezente Gabe von Volumenersatz, Steroiden und Muskelrelaxantien [75]. Auch nach Überleben des Krankheitsereignisses zeichnen sich schwere Komplikationen mit Langzeitfolgen des Herz-Kreislaufsystems, kognitiver Beeinträchtigung und Einbußen im Arbeitsalltag ab [26,54,55,60,66].

1.3 Pathophysiologie des ARDS

In der Pathogenese des ARDS wird die erhöhte Permeabilität pulmonaler Gefäße durch die Beeinträchtigung der alveolo-kapillären Barriere als entscheidender Mechanismus angesehen [8,138]. Diese Barriere besteht hauptsächlich aus einer endothelialen und epithelialen Zellschicht einschließlich der gemeinsamen Basalmembran und Extrazellulärmatrix. Durch Gewebsschädigungen und den Untergang der intakten pulmonalen mikrovaskulären Architektur während der akuten Phase der Erkrankung kommt es zu einem gesteigerten Einstrom proteinreicher Flüssigkeit und weiteren Komponenten des Blutes so auch Immunzellen aus den Kapillaren in das alveoläre Lumen [23,147]. Das daraus resultierende Lungenödem beeinträchtigt den Gasaustausch und führt zur Ausbildung klinisch manifestierbarer Symptome wie Tachypnoe und Hypoxie. Dabei trägt das Ausmaß der epithelialen Zellschädigung am meisten zur Entstehung der Barrieredysfunktion bei und korreliert mit dem Outcome der Patienten [92,93,148]. Da das Epithel auch bei der Reabsorption von Flüssigkeit, an Reparaturvorgängen und der Surfactantproduktion beteiligt ist, führt dessen Untergang zu einem Ausbleiben dieser Mechanismen. Dadurch wird die Atemarbeit erschwert, was zur Hypoxämie führt [45,46,83,137]. Zusätzlich ist der natürliche Schutz gegenüber Pathogenen durch den Wegfall einer intakten Epithelzellbarriere kompromittiert, so dass virale und bakterielle Erreger über den Luftweg erleichtert in den Blutkreislauf eindringen und ein septisches Ereignis auslösen können [80,147]. Im späteren Verlauf der Erkrankung, der proliferativen Phase, finden durch die Einwanderung von Fibroblasten fibroproliferative Umbauvorgänge statt, die die Elastance der Lunge verringern und zu emphysematösen Veränderungen führen. In diesem Stadium kommt es bei etwa der Hälfte der Erkrankten durch eine alveoläre Obliteration zu einem Verlust von funktionellen alveolo-kapillären Einheiten, was letzten Endes mit einer gesteigerten Mortalität und Morbidität vergesellschaftet ist [90,104,113,131]. Als Erklärungsansatz für die zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge, die zur Zerstörung der alveolären Epithelzellen führen, wurden zwei Hypothesen aufgestellt: Die Neutrophilen- und die Epithelzellhypothese.

1.4 Die Neutrophilenhypothese

Neutrophile Granulozyten (PMN) befinden sich unter physiologischen Bedingungen vornehmlich in zwei Reservoirs: Zum einen größtenteils frei zirkulierend in der Blutbahn und zum anderen als residuelle nicht-zirkulierende Zellen im Intravasalraum einiger Organe, insbesondere der Leber, Milz, Knochenmark und Lunge [58,89,123,143]. In der Frühphase des ARDS kommt es zu einer gesteigerten intraalveolären Produktion von Chemokinen und Zytokinen, welche die Rekrutierung und Migration von lokalen und systemisch zirkulierenden Neutrophilen zum Ort der Schädigung einleiten [69,127,152]. Zu den wichtigsten Vertretern für die Rekrutierung von PMN gehören neben G-CSF und GM-CSF das humane IL-8 (Interleukin-8) [63], dessen murine Vertreter die beiden Cytokine MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2) und KC (keratinocyte-derived chemokine), darstellen. Auch in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von ARDS Patienten lässt sich eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten nachweisen [5,125]. Die proinflammatorischen Mediatoren führen darüber hinaus zu einer verminderten Apoptoserate in neutrophilen Granulozyten [33,34,100]. Dieser antiapoptotische Effekt wird vermutlich durch einen TNF- α -vermittelten Signalweg über NF- κ B bis zur Produktion antiapoptotischer Signalmoleküle gesteuert [72]. Die in ihrer Lebensdauer verlängerten Granulozyten tragen im aktivierten Zustand durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, Wasserstoffperoxid und proteolytischen Enzymen wie Neutrophilen-Elastase, Matrix-Metallo Proteasen und Cathepsinen zu einem vermehrten Gewebeschaden bei, was letztendlich zur Zerstörung der alveolären Epithelzellen führt [24,32,78,79,135].

1.5 Die Epithelzellhypothese

Oben genannte Erläuterungen legen nahe, dass PMN eine kritische Rolle bei der Entstehung eines ARDS einnehmen. Da jedoch die Entwicklung eines ARDS auch bei Patienten mit Neutropenie beschrieben ist, liegt es nahe, dass auch andere Mechanismen in der Pathophysiologie von Bedeutung sind [81,112,144]. Das alveoläre Epithel im Lungengewebe wird zu 90 % von Typ 1 Epithelzellen ausgekleidet, welche somit den Hauptanteil der alveolo-epithelialen Trennschicht darstellen. Ihre Regeneration erfolgt aus den Surfactant-produzierenden Typ 2 Epithelzellen, die nur etwa 10 % der Oberfläche einnehmen [147]. Bachhofen et al. konnte Apoptose-typische Zellveränderungen in Typ 2 Epithelzellen bei Patienten mit ARDS nachweisen [9]. Außerdem konnten in der BAL von ARDS Patienten erhöhte Konzentrationen an löslichem Fas-Liganden (sFasL), TRAIL und

TNF- α gemessen werden [4,71,82]. Dabei korrelierte die Konzentrationshöhe dieser Todes-Liganden mit dem Schweregrad der Erkrankung. In einem experimentellen in vitro Ansatz ließ sich mit der von ARDS Patienten gewonnenen BAL und der darin enthaltenen Liganden Apoptose an Epithelzellen induzieren [50,101].

Somit scheint der apoptotische Zelluntergang des Alveolarepithels einen wesentlichen Bestandteil in der Pathogenese des ARDS darzustellen, indem er die alveolo-kapilläre Permeabilität erhöht, was zur Bildung eines Ödems und zur Einwanderung von Entzündungszellen führen kann [12,141]. Dass dabei die Alveolarepithelzellen nicht die einzigen für apoptotische Mechanismen empfängliche Zelltypen sind, konnte in Studien belegt werden, die Zelltodmechanismen auch in Endothelzellen und Perizyten nachgewiesen haben. Diese wiederum stellen einen integralen Bestandteil der alveolo-kapillären Barriere dar und begünstigen durch ihren Untergang ARDS-typische pathomechanistische Prozesse [1,10,11,31].

1.6 Die Rolle des Fas-Signalweges auf die Apoptose

Der Fas-Rezeptor, als ein Mitglied der TNF-Superfamilie, befindet sich auf der Oberfläche einer Vielzahl an Zellen, darunter neutrophile Granulozyten, Makrophagen und auch pulmonale Epithelzellen [13,22,30,101,110,115,145]. Die Induktion seines intrazellulären Signalweges erfolgt nach Bindung des Fas-Liganden (FasL). Dieser wird ebenfalls auf der Oberfläche zahlreicher Zellen exprimiert und kann nach proteolytischer Abspaltung durch Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP), darunter vornehmlich MMP-7, in eine lösliche Form übergehen [13,30,101]. Viele Studien konnten aufzeigen, dass der Fas-Rezeptor Signalweg eine Schlüsselrolle bei zahlreichen Lungenerkrankungen, infektiöser oder aseptischer Genese spielt. Dabei stellte man fest, dass die Expression des FasL auf Lymphozyten zur Apoptose von Alveolarmakrophagen bei akuter Infektion der Lunge führt [68]. Speziell Fas-Rezeptor-aktivierende Liganden und Antikörper zeigen diesen pro-apoptotischen Effekt auch im Lungenepithel [85,102,120]. Desweiteren konnte durch die Blockade des Fas/FasL Systems die LPS-induzierte Apoptose und Zellschädigung der Alveolen vermindert werden [74,88]. In Maus-Modellen mit indirektem ARDS zeigte sich bei Verwendung von Fas-defizienten Mäusen und durch eine Herabregulation des Fas-Rezeptors mittels „small interfering Ribonukleinsäure“ (siRNA) eine verringerte Apoptose der alveolären Epithelzellen und eine geringere Ausprägung des ARDS Schweregrades [118,120].

1.7 Die Rolle des Fas-Signalweges bei Inflammation

Die Fas-Signalkaskade aktiviert nicht nur Proteine für den apoptotischen Prozess einer Zelle. Sie ist zudem auch für die Produktion proinflammatorischer Zytokine zuständig. Assoziierte inflammatorische Kaskaden wurden in zahlreichen Zellen nachgewiesen, darunter auch in Makrophagen [114], Keratinozyten [38], dendritische Zellen [49] und Hepatozyten [111,142]. Der zugrunde liegende Signalweg wird über cFLIP (cellular FLICE [alias Caspase-8]-like inhibitory protein) reguliert. Dies ist ein Homolog zur Caspase-8 und liegt in 2 Isoformen vor: cFLIPL (long) und cFLIPS (short). Nach Aktivierung der Kaskade durch FasL führt die Bindung von cFLIPS am DISC zur Inaktivierung von Caspase-8 [140]. Die Isoform cFLIPL interagiert mit TRAF1 (TNF receptor associated factor 1) und TRAF2 und führt somit zur Aktivierung von NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) und ERK (extrazellulär regulierte Kinase) [43,106,134]. Die gesteigerte Transkriptionsrate von NF- κ B führt somit zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Zyto- und Chemokinen. In diesem Zusammenhang konnte in Mausstudien gezeigt werden, dass die Applikation eines löslichen FasL mit einer erhöhten Produktion von MIP-2, sowie einer gesteigerten RNA-Expression von IL-1- β (Interleukin-1 beta), MIP-2, MIP-1 α MIP-1 β einherging [59,107]. Speziell in Lungenepithel-Zellen konnte in vitro eine dosisabhängige Sekretion von KC nach Stimulation der Fas-Signalkaskade nachgewiesen werden [39]. Doch auch durch die in vivo Applikation eines Fas-Rezeptor-aktivierenden Antikörpers konnten diese Beobachtungen gestützt werden [98,102,152].

1.8 Zielsetzung der Studie

Inflammation und Apoptose werden als zwei mögliche Pathomechanismen bei der Genese der verschiedenen ARDS Formen angesehen. Aus oben genannten Erläuterungen geht hervor, dass durch Stimulation des Fas/FasL Systems sowohl inflammatorische, als auch apoptotische intrazelluläre Signalprozesse induziert werden. Darüber hinaus konnte in Studien eine direkte Beteiligung der Fas-Signalkaskade an pathomechanistischen Prozessen die auch im ARDS ablaufen nachgewiesen werden. Einerseits durch die Induktion der Apoptose in pulmonalen Epithelzellen und andererseits durch die Produktion chemotaktischer Zytokine und Chemokine, die zur Akkumulation von Immunzellen, im Besonderen PMNs, in der Lunge führen. Es ist jedoch weiterhin unklar, welche

pathogenetische Rolle des Fas-Systems auf die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose und Inflammation bei der Entstehung eines ARDS unter klinisch relevanten Konditionen einnimmt. Dies wurde in vorliegender Arbeit mittels eines klinisch relevanten direkten ARDS Modells bestehend aus Thoraxtrauma (TxT) und Sepsis an der Maus untersucht.

Folgende Hypothesen sollten hierbei überprüft werden:

1. Der extrinsische Todesrezeptorweg des Fas-Rezeptors trägt wesentlich zur Pathogenese des ARDS bei, indem er bei der Regulation sowohl von Apoptose als auch Inflammation in einem klinisch relevanten „Double-Hit“ Modell der Maus beteiligt ist.
2. Eine gezielte Ausschaltung des Fas/FasL Weges durch Verwendung von Fas-Rezeptor-mutierten Mäusen (Fas^{lpr}), vermindert die Ausprägung des ARDS im Tiermodell und kann so therapeutisch genutzt werden.

2 Material & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Software

Block-Thermostat (Hitzeblock)	Grant Instruments, Cambridge, UK
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Deutschland
Druckwellengenerator	Wissenschaftliche Werkstatt Feinwerktechnik, Universität Ulm, Oberer Eselsberg
Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss, Deutschland
Filmkassette	Amersham Bioscience, UK
Kodak Entwicklungsmaschine	Kodak, New York, USA
Tecan Sunrise Plate Reader	Tecan, Schweiz
Mini Protean Tetra System	Bio-RAD, Hercules, USA
Power PAC HC	Bio-RAD, Hercules, USA
Semi-DRY-Transfer Cell	Bio-RAD, Hercules, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage CP 2202S	Sartorius AG, Deutschland
Wasserbad SW23	Julabo Labortechnik GmbH, Deutschland
Wellwash 4 MK 2	Thermo Fisher Scientific
Leica Asp200	Leica Microsystems, Wetzlar
Ausgießstation Microm EC -350-1	Microm, Walldorf
Microtom Microm HM450	Microm, Walldorf

Ultra-Turrax T25 Disperiergerätes mit Aufsatz S25N10	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Rollmischer MIXER SRT1	Stuart Scientific, UK
Schüttler für Waschen WB	Stuart Scientific, UK
Ultraschallpulswellengenerator	Bandelin Sonopuls HD2070; Bandelin GmbH & Co. KG, Berli
Mikroskop Axio Imager M1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axio Vision Version 4.4	Carl Zeiss AG
Sigma Stat (Version 3.5)	SPSS Science Software GmbH, Erkrath
SigmaPlot (Version 11.0)	SPSS Science Software GmbH, Erkrath

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

30 % H ₂ O ₂	Fischer, Deutschland
DMSO Hybri-Max	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HCL	Riedel-de Haen, Deutschland
HCL 37 %	VWR, Radnor, USA
Low- Range Rainbow coloured	Amersham Bioscience, UK
Protein molecular weight markers	Amersham Bio Sciences, Freiburg
Methanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Milchpulver	Roth, Deutschland
PBS	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Tri-Natrium Citrat Dihydrat	AppliChem GmbH, Deutschland

Formalinlösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HTAB: 0,5 %	
Hexadecyltrimethylammoniumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetramethylbenzidin (TMB)	Becton Dickinson & Co, Fr. Lakes, USA
Perchlorsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BCA-Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kupfersulfatlösung 4 %	Merck Chemicals, Darmstadt
Mayers Hämalun	Merck Chemicals, Darmstadt
Bisbenzimidlösung	
0,5 mg/l in PBST gelöst	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dako Cytomation Fluorescent Mounting Mediums	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Ammonium Persulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TMB-Reagenz	Becton Dickinson & Co, Fr. Lakes, USA
Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.3 Antikörper

Anti-Rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling, Boston/Danvers, USA
β-Actin Rabbit-Antikörper	Cell Signaling, Boston/Danvers, USA

Anti Cleaved-Caspase 3

Cell Signaling, Boston/Danvers, USA

2.1.4 Puffer und Lösungen

Ammonium Persulfat (APS)

0,25 g/ml in Aqua dest.

Citrat-Puffer

10 mM, pH 6,0: 1,47 g Tri-Natrium Citrat Dihydrat/ 500 ml Aquadest, Merck, Darmstadt

Sammel-Gel-Puffer

6,05 g/100 ml Tris-HCL USB, Cleveland, USA; 0,4 g/100 ml SDS Fluka, Milwaukee, USA; eingestellt auf pH 6,8

Sammel-Gel

0,8 ml Rotiphorese Roth, Deutschland;
1,25 ml Sammel-Gel-Puffer, 2,95 ml Aqua bidest, 20 µl 25 % APS, 10 µl Temed, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Trenn-Gel-Puffer

91 g/500 ml Tris HCL USB, Cleveland, USA

Trenn-Gel

6,0 ml Rotiphorese Gel 30 Roth, Deutschland;
2,5 ml Trenn-Gel-Puffer, 1,5 ml Aqua bidest, 30 µl 25 % APS, 5 µl Temed, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Lauf-Puffer

3,03 g/l Tris HCL, USB, Cleveland, USA;
24 g/l Glycine, AppliChem GmbH, Deutschland; 1,66 g/l SDS, Fluka, Milwaukee, USA

Phosphat- Puffer

0,1 % Natriumdodecylphosphat, Fluka, Milwaukee, USA; 1 % Igepal CA 630, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 10 mg/ml Phenylmethansulfonyl, 100 mM Natriumorthovanadat, 50 µl/ml Proteinase Inhibitor, alle Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

10*PBS	24,2 g/l Trizma Base, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA; 80 g/l NaCl, Fluka, Milwaukee, USA, eingestellt auf pH 7,6
PBST	100 ml 10*TBS, 900 ml Aqua bidest, 10 ml 10 % Tween, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Sample-Puffer	9,5 ml Laemmli Sample Buffer, Bio-RAD, Hercules, USA; 500 µl 2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
RIPA-Puffer	1 % Igepal CA 630, 0,1 % SDS, 0,5 % Natriumdeoxylcholat, 1 % PMSF, 100 mM Natriumorthovanadat, Proteinaseinhibitor, alle Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Transfer-Puffer	2,93 g/l Glycine, AppliChem GmbH, Deutschland; 5,81 g/l Tris HCL, USB, Cleveland, USA; 0,375 g/l SDS, 20 % Methanol, beide Fluka, Milwaukee, USA
ELISA Waschpuffer	165 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,9 mM KH ₂ PO ₄ mit Zusatz von 0,5 g Tween pro Liter ddH ₂ O, alle Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TBST	0,1 % Tween in PBST
Reagent Diluent	1 g Bovines Serum Albumin pro 100 ml PBS
MPO-Puffer 1 (0,08M KPP)	10,35 g KH ₂ PO ₄ in 950 ml Aqua dest und 0,91 g K ₂ HPO ₄ in 50 ml Aqua dest; eingestellt auf pH=5,4
MPO-Puffer 2 (0,05M KPP)	6,12g KH ₂ PO ₄ in 900 ml Aqua dest und 0,91 g K ₂ HPO ₄ in 50 ml Aqua dest; eingestellt auf pH=6

MPO-Puffer 3 (0,05M KPP)	0,5 g HTAB in 100 ml MPO-Puffer 2
TMB-Lösung	10 mg TMB in 10 ml DMSO
H ₂ O ₂ Lösung	670 µl 30 % H ₂ O ₂ in 40 ml MPO-Puffer 1; eingestellt auf pH=5,4
BCA/Kupfersulfat-Reagenz	1,4 ml Kupfersulfat 4 % in 70 ml BCA Reagenz
Proteinase K- Puffer	Proteinase K Roche Applied Science, Mannheim in Tris(Tris(hydroxymethyl)- aminomethan)-HCl USB, Cleveland, USA; eingestellt auf pH=7,6

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Aqua ad iniectabilia	Fresenius SE & Co. KgaA, Bad Homburg
BD Falcon Tube	BD Bioscience, San Jose, USA
Celluloseacetat Rotrand-Filter 0.2µm	Whatman GmbH, Dassel
Hybond P-PVDF Membran	Amersham Biosciences, UK
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, UK
96-Well Mikrotiterplatten	NUNC GmbH & Co. KG; Wiesbaden
Nadel 22 G	B.Braun AG, Melsungen
Nylonfaden (4-0)	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Sevorane TM	Abbott, Wiesbaden
Softaept	B.Braun AG, Melsungen
Ringer-Lösung	Baxter, Deerfield, USA
Buprenorphin-Lösung (Temgesic [®])	Essex Pharma GmbH, München
Mylarfolie	DuPont GmbH, Bad Homburg

Heparin-Natrium „Multi“ 10000 I.E./ml	B.Braun AG, Melsungen
4-0 Vicryl™ 910; Ethicon Inc	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Polyethylen-tubus	Smiths Medical International Ltd.; Ashford, UK
26/22 G Kanüle	B.Braun AG, Melsungen
Spritze BD Plastipak™	Becton Dickinson & Company Franklin Lakes, New Jersey, USA
Venenverweilkanüle Vasofix®	B.Braun AG, Melsungen
Zellulosefilter	Whatman GmbH, Dassel
Simport Histosette® I	
Tissue Embedding Cassette 45° Angle	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.6 Kits

BD OptEIA™ ELISA Set	BD Pharmingen, San Diego, USA
DuoSet® ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
BCA Protein Assay Kit	Pierce Protein Products, Rockford, USA
ChemiGlow West Chemiluminescence Substrat Kit	Protein Simple, Santa Clara, USA
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Stripping-Solution	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
TMB-Reagenz	BD Pharmingen, San Diego, USA
Bio-Plex Pro™	Bio-Rad, Hercules, USA
MPO-Standard: 1000 mU/ml	Merck Chemicals, Darmstadt
In situ Cell Death Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.7 Mäusstämme

B6.MRL-Fas^{lpr}/J (lpr)

Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA

C57BL/6

Charles River, Sulzfeld

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuch

Zur Induktion eines akuten Lungenschadens wurde ein bereits etabliertes Double-Hit Modell, bestehend aus Thoraxtrauma und zökaler Ligation und Punktion (CLP), durchgeführt. Zum Einsatz kamen männliche, 6-8 Wochen alte Mäuse. Die Haltung der Tiere samt der Versuchsdurchführung fand in der Bereichstierhaltung Safranberg in Ulm statt, wo die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter hatten. Dort herrschte eine zirkadiane Tag/Nacht Rhythmik von 12 Stunden bei einer Raumtemperatur von 21° Celsius und 50 % Raumluftfeuchtigkeit. Sämtliche Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen geprüft und genehmigt (Versuchsnummer 937).

Zur Durchführung des Thoraxtraumas wurden die Mäuse über ein Gemisch aus Sevofluran (2,5 %) und Sauerstoff (97,5 %) narkotisiert und anschließend in Rückenlage auf einer Plexiglasplatte an ihren Extremitäten mittels Klebeband fixiert. Thorax und Abdomen wurden durch einen kommerziellen Rasierer (Braun AG) rasiert, danach Xiphoid und Rippenwinkel farblich markiert, um den Zylinder des Druckwellengenerators exakt 1,5cm über der Sternummitte zu positionieren. Das Trauma selbst erfolgte über einen Luftdruckimpuls durch den Druckwellengenerator: Mittels eines Hochgeschwindigkeitsventils wurde bei 13 bar Luftdruck eine 50µm dünne im Zylinder eingespannte Mylarfolie zum Reißen gebracht. Dadurch konnte eine gezielte Druckwelle auf den Brustkorb der Maus in Inspirationsstellung ausgelöst werden, um eine Lungenkontusion zu bewirken und den abdominalen Schaden der Bauchorgane zu minimieren. Nach dieser Prozedur wurde die Narkose beendet und die Tiere wieder in ihre Käfige gebracht. Dasselbe Verfahren wurde ebenfalls bei den Kontrolltieren (Sham) durchgeführt, ohne jedoch ein TxT zu induzieren. Zur Durchführung der CLP wurden die Tiere 24 Stunden nach TxT wie vormals narkotisiert und in Rückenlage fixiert. Das Abdomen wurde mittels Softasept desinfiziert und über einen 1,5 cm langen Schnitt über der Mittellinie sowohl Bauchwand, als auch Peritoneum inzidiert. Das Zökum wurde aufgesucht und dargestellt sowie 1 cm oral der Ileozökalklappe mittels Ligaturfaden ligiert und anschließend mit einer 22 G Kanüle

sowohl proximal als auch distal des ligierten Zökums perforiert. Hierdurch konnte Fäzes aus den Perforationsstellen austreten ohne die Passage des Darminhaltes im Intestinaltrakt zu unterbrechen. Peritoneum und Bauchwand wurden anschließend jeweils mit Einzelknopfnähten mittels Nähfaden verschlossen. Die Narkose wurde anschließend beendet und nachfolgend den Tieren ein subkutaner Bolus aus 1 ml Ringer-Laktat Lösung und 0,3 mg/ml Buprenorphin injiziert, was alle 8 Stunden wiederholt wurde. Bei Kontrolltieren wurde dieselbe Prozedur durchgeführt, jedoch die Ligatur und Perforation des Zökums unterlassen.

Da die geplanten Analysen der Lunge nicht an jeweils einem Tier pro Gruppe durchführbar waren, wurden die Mäuse zur Probengewinnung nochmals randomisiert in 3 Gruppen unterteilt: zur Entnahme von Blut und Lungengewebe für die Bestimmung der Zytokin- und Chemokin-Konzentration, sowie zur Ermittlung der Myeloperoxidase Aktivität, und Apoptosebestimmung (n=8 pro Gruppe); zur Gewinnung von BAL für die Ermittlung der Zytokin- und Chemokin-Konzentration und für die Bestimmung der bronchoalveolären Leckage (n=8 pro Gruppe); für histologische Untersuchungen der gesamten Lunge (n=4 pro Gruppe). 12 bzw. 24 Stunden nach CLP wurden die Tiere mittels Sevofluran-Überdosis narkotisiert, anschließend in Rückenlage fixiert und sowohl thorako- als auch lapratomiert (Abb. 1).

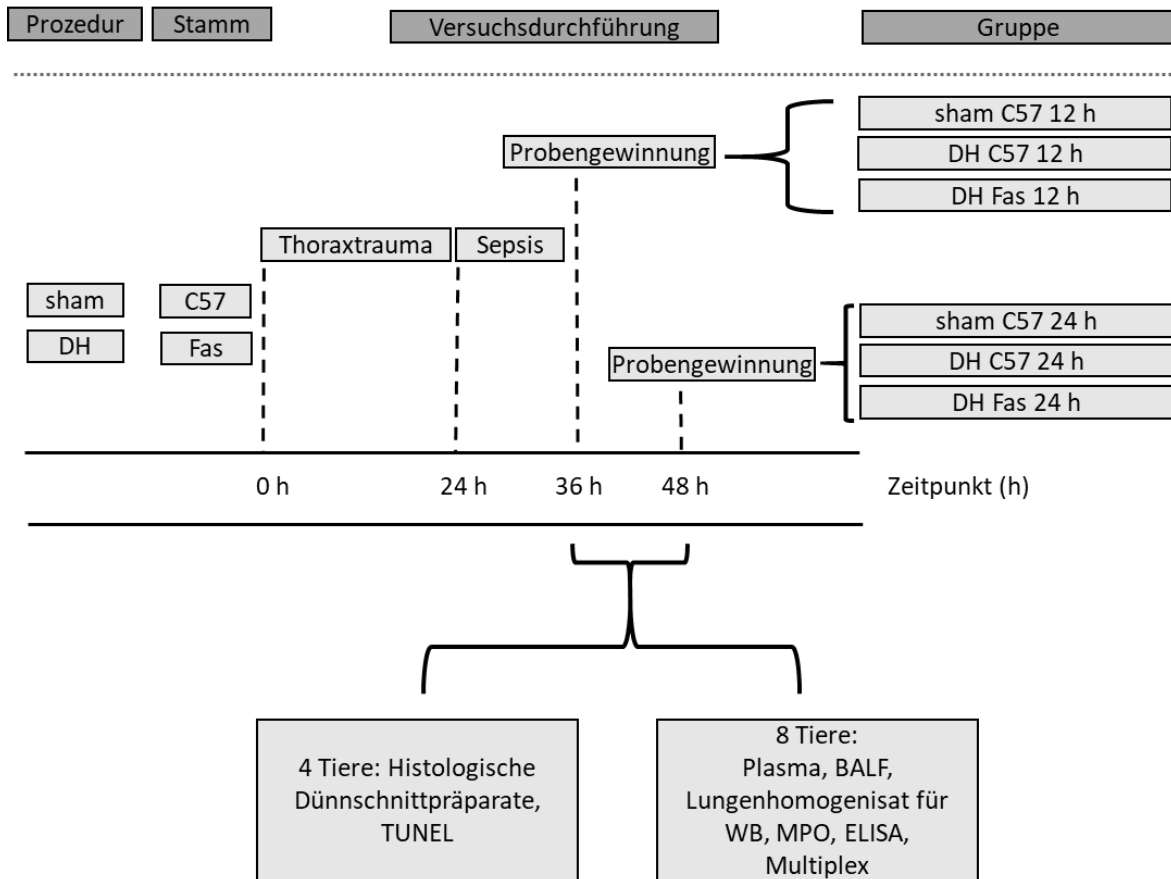


Abb. 1: Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs und Einteilung der Versuchsgruppen. DH = Double-Hit (Thoraxtrauma + Sepsis), C57 = Mausstamm C57BL/6, Fas = Mausstamm B6.MRL-Fas^{lpr}/J (lpr), BALF = bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit, WB = Western-Blot, MPO = Myeloperoxidase, ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay.

2.2.2 Probenaufbereitung

Die Blutgewinnung erfolgte über Punktion der rechten Herzkammer mittels einer 26 G Kanüle, aufgesteckt auf eine 1 ml Spritze in der vorher 50 µl Heparin aufgezogen wurde. Das Blut wurde im Anschluss 15 min bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert, der Plasmaüberstand abgenommen, aliquotiert und bei -80°C bis zur Durchführung der ELISA und Multiplex Analysen gelagert.

Zur Gewinnung der BAL wurde die Trachea mit einem Polyethylentubus (0,58 mm Innendurchmesser, 0,96 mm Außendurchmesser) kanüliert, mit Ligaturfaden um die Trachea fixiert und 300 µl eisgekühltes PBS über eine 1 ml Spritze dreimal appliziert und wieder aspiriert. Anschließend wurde die BAL in ein Eppendorf-Tube, vorgelegt mit 5 µl Proteaseinhibitor überführt. Unmittelbar danach wurde die BAL bei 350 x g und 4°C

zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Für die Organentnahme wurde zunächst der Kreislauf blutleer gespült indem man nach Herzpunktion 2 ml eiskaltes PBS in das linke Herzhorn injizierte. Die jeweiligen Lungenlappen überführte man nachfolgend einzeln in 1,5 ml Eppendorf-Tubes und legte diese zum Schockfrost in Flüssigstickstoff.

Der jeweils rechte Unter- und Herzlappen der Lunge wurde für anschließende Western Blot Analysen in ein 2 ml Eppendorf-Tube überführt, in das bereits 200 µl RIPA-Puffer vorgelegt waren. Die Homogenisation der auf Eis gekühlten Proben erfolgte mittels Ultra Turrax Dispersiergerätes bei 16000 rpm. Das Homogenat wurde danach bei 16000 x g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und aliquotiert. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C tiefgefroren. Der jeweils linke Lungenlappen wurde für die Durchführung von ELISA und Multiplex nach der Homogenisation zusätzlich mittels Ultraschallgenerator zu 2 mal 5 Zyklen sonifiziert. Anschließend wurden die Proben bei 16000 x g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Das Vorgehen zur Gewinnung von Lungengewebe für histologische Zwecke erfolgte ebenfalls über vorherige Blutgewinnung aus der rechten Herzkammer mit anschließendem Spülen durch die linke Herzkammer. Die Trachea wurde mit einer Venenverweilkanüle kanüliert und mit einer Ligatur fixiert. An diese angeschlossen war ein Schlauchsystem, das über ein Reservoir, welches 20 cm über den Brustkorb der Maus aufgehängt war, 10 % Formalinlösung mit einem Druck von 20 cmH₂O in die Lunge füllte. Die Lunge wurde anschließend zusammen mit dem Herz aus dem Thorax freipräpariert und 24 h in 10 % Formalinlösung fixiert. Danach wurden beide Lungenflügel auseinanderpräpariert, einzeln in Einbettkassetten gelegt und 5 Stunden unter fließendem Wasser gespült. Es folgte eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (70 %-, 80 %-, 90 %-, 100 %- Ethanol, Methylbenzoat, Toluol, Xylol und erneut 100 %- Ethanol) im Einbettautomaten Leica Asp 200. Die Proben wurden an der Ausgießstation Microm EC -350-1 in Paraffinblöcke eingebettet und anschließend am Mikrotom 2µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Objektträgern bei 4°C bis zur Histologischen Analyse aufbewahrt wurden.

2.2.3 Proteinbestimmung

Die Gesamt-Proteinbestimmung aus BAL, Lungengewebe und Plasma erfolgte mittels des BCA Protein Assay Kit. Die BAL wurde 1:10, Lungenhomogenat 1:40 und Plasma 1:120 mit Aqua dest verdünnt und jeweils 10 µl der Verdünnung in eine 96-Well Platte pipettiert.

Mittels der im Kit enthaltenen Reagenzien A und B (im Verhältnis 51:1) ließ sich durch einen Farbumschlag, hervorgerufen durch Peptidverbindungen in alkalischem Milieu (Biuret-Reaktion), die Absorption im Tecan Sunrise-Reader bei 562 nm messen. Durch den Vergleich mit Standardproben bekannter Konzentrationen ließen sich aus den Absorptionswerten die Proteinmengen in den jeweiligen Proben berechnen.

2.2.4 Western-Blot Analyse

Zur semiquantitativen Bestimmung der Caspase 3 in Lungenhomogenaten wurde die Western Blot Analyse herangezogen. Für die Elektrophorese wurden die einzelnen Proben mit Aqua dest. verdünnt, um ein Endvolumen von 20 µl mit einer Gesamtproteinmenge von 60 µg pro Probe zu erhalten. Diese wurden im Anschluss mit 15 µl Sample-Puffer versetzt und 7 min auf einem Block-Thermostat bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese selbst erfolgte in einer Kammer des Mini-Protean Tetra Systems, betrieben durch das Power Pac HC bei einer Spannung von 125V und einer Laufzeit von 4 Stunden. Der low-range rainbow coloured protein molecular weight marker diente hierbei als Marker für die Laufweite der aufgetrennten Proteine. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele im mit Hilfe des Semi Dry Transfer Cell 2 Stunden bei 0,18 Ampere (betrieben durch das Power Pac HC) auf eine Hybond P-PVDF Membran transferiert. Nach Abschluss des Blottingvorgangs wurden die Membranen in mit 5 % Milchpulver-versetztem TBST für 1,5 Stunden geblockt. Zusammen mit 5 ml 5 % Milchpulver/TBST und dem Anti Cleaved-Caspase 3 Antikörper (Verdünnung 1:500) lagerten die Membranen 24 Stunden bei 4°C in einem Falcon auf dem Rollmischer Mixer SRT1. Nach drei Waschschritten mit je 15 min in TBST, folgte die Inkubation der Membran für 1 Stunde in 5 ml TBST mit Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antikörper in einer Verdünnung von 1:1500. Nach viermaligen Waschen von je 15 min in TBST wurde die Membran mit ChemiGlow West Chemiluminescence versetzt, in einer Filmkassette für 1 min inkubiert und anschließend mittels einer Kodak Entwicklermaschine auf den Hyperfilm ECL übertragen. Zur Ladekontrolle wurde β-Aktin Fraktion bestimmt. Hierzu wurden die Membranen in für 5 min in TBST gewaschen und anschließend in Stripping Solution (1:10 verdünnt mit Aqua dest) überführt und für 15 min auf dem Schüttler gewaschen. Nach zweimaligen Waschen für 15 min in TBST wurde die Membran für 30 min in 5 % Milchpulver/TBST geblockt. Darauf folgte die Inkubation bei 4°C über Nacht auf dem Rollmischer in 5 ml einer Lösung bestehend aus β-Actin Rabbit-Antikörper (1:1000 verdünnt in 5 % Milchpulver/TBST). Die weitere Vorgehensweise zur Entwicklung eines Films erfolgte wie oben beschrieben. Die semiquantitative Auswertung erfolgte durch

Einscannen der Hyperfilme und Zuhilfenahme der Software FluorTech (Alpha Innotech, San Leandro, USA).

2.2.5 ELISA

Die Bestimmung der Zytokin/Chemokin-Konzentrationen in Plasma, BAL und Lungenhomogenat erfolgte mittels DuoSet® ELISA Kits (für KC, MIP-2) bzw. BD OptEIA™ ELISA Set (für MCP-1). Hierfür wurde der jeweilige Capture-Antibody gemäß Herstellerangaben 1:180 in PBS (KC und MIP-2) oder 2M Natriumbicarbonatpuffer mit pH=6 (MCP-1) verdünnt und je 100 µl pro Well in einer Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden mit Hilfe des Wellwash MK2 die Mikrotiterplatten dreimal mit ELISA Waschpuffer gewaschen und mit 200 µl Reagent Diluent pro Well für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurden je 100 µl des Standards und der Proben in Doppelbestimmung in die einzelnen Wells pipettiert. Die BAL Proben wurden unverdünnt eingesetzt, wohingegen das Plasma für die KC und MIP-2 Messungen 1:6 und für die MCP-1 Messungen 1:2 mit Reagent Diluent verdünnt wurde. Das Lungenhomogenat wurde für die KC und MIP-2 Bestimmung jeweils 1:96 und für MCP-1 1:4 verdünnt. Die Platten inkubierten anschließend bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligen Waschen wurde der Sekundärantikörper aus den jeweiligen Kits 1:180 verdünnt in Reagent Diluent in die einzelnen Wells gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation und drei Waschschritten wurde eine 1:200 verdünnte Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Lösung für 20 Min (KC und MIP-2) bzw. 30 Min (MCP-1) zugegeben. Nach dreimaligen Waschen wurde 100 µl TMB-Reagenz in die einzelnen Wells pipettiert und lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 30 Min inkubiert. Zum Stoppen der HRP-vermittelten Farbreaktion wurde nach Ablauf der Zeit 50 µl von einer 2 N Schwefelsäurelösung zugegeben. Die Absorption konnte mit Hilfe des Tecan ELISA Readers bei 450 nm gemessen werden und die Konzentration der jeweiligen Zytokine anhand der ermittelten Standardkurve berechnet werden.

2.2.6 Multiplex

Für die Bestimmung der Zytokine/Chemokine TNF- α , GCSF, IF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-1 wurde die „Cytometric Bead Array“ Technik mittels Bio-Plex Pro™ Kit herangezogen. Zuerst wurde eine geometrische Verdünnungsreihe mit dem mitgelieferten Standard hergestellt und auf Eis gelagert. Zur Verdünnung von Standard und Proben wurde eine Lösung bestehend aus PBS und 0,5 % Fetales Kalberserum (FCS) verwendet. Die BAL

wurde unverdünnt eingesetzt, Plasma wurde 1:4 und Lungenhomogenat 1:8 verdünnt. Zur weiteren Vorbereitung wurde ein „Bead-Mix“ hergestellt, der für jedes zu bestimmende Zytokin eine ausreichend große Menge an „Capture Beads“ enthielt. Die im Kit enthaltene 96-Well Platte wurde mit 100 µl „Assay Buffer“ vorbenetzt und 50 µl des Bead-Mixes in jedes Well hinzugegeben. Anschließend wurde die Platte zweimal mit „Washbuffer“ gewaschen. Danach wurden je 50 µl Probe und Standard in die Wells pipettiert und die Platte für 30 Min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligen Waschen wurden 25 µl „Detection-Antibody“ in jedes Well pipettiert und weiter 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte und schließlich die Zugabe von 50 µl einer Streptavidin-PE-Lösung. Nach einer 10 minütiger Inkubation und dreimaligem Waschen wurde 125 µl „Assay Buffer“ hinzugefügt. Die Messung erfolgte am Bioplex® 200 und die Auswertung wurde mit Hilfe der Bio-Plex Manager™- Software durchgeführt.

2.2.7 Myeloperoxidase Aktivität

Zur Messung der Myeloperoxidase Aktivität in Neutrophilen Granulozyten musste das Lungengewebe zuerst homogenisiert werden. Dazu wurde der kryokonservierte rechte obere Lungenlappen je einer Maus in ein mit 1,5 ml Puffer 3 befülltes Reagenzglas überführt und auf Eis mittels des Ultra Turrax Dispersiergerätes bei 16000 rpm homogenisiert. Anschließend wurden diese Proben bei 60°C im Wasserbad für 2 Stunden erhitzt und schließlich bei 4°C über Nacht aufbewahrt und abgekühlt. Am Folgetag wurden die Proben zuerst auf dem Vortex Genie 2 aufgeschüttelt und dann bei 3950 x g für 15 Min zentrifugiert. In eine 96-Well Platte wurde nun je 25 µl Überstand der Probe und des Standards, der zuvor in einer geometrischen Verdünnungsreihe mit MPO-Puffer 3 verdünnt wurde, pipettiert. Dazu wurden 25 µl TMB- und 200 µl H₂O₂-Lösung gegeben und anschließend die Platte für 5 Min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl 2M H₂SO₄ Lösung gestoppt und bei 450 nm im Tecan-Reader eingelesen. Zur vollständigen Auswertung der Ergebnisse folgte nun eine Proteinbestimmung aus den Probenüberständen. Hierzu wurde zunächst 100 µl Perchlorsäure in die Reagenzgläser hinzugegeben, anschließend aufgeschüttelt und bei 3950 x g für 10 Min zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte, bei denen jeweils der Überstand verworfen wurde, 3 ml Aqua dest hinzugefügt, erneut aufgeschüttelt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Danach wurde das Sediment mit 2 ml einer 0,5 N NaOH Lösung versetzt und 30 Min bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Für die Messung wurde zunächst ein Standard, bestehend aus BSA in

Aqua dest geometrisch verdünnt, hergestellt. Nach der Inkubation wurde jeweils 15 µl des Standards und der Proben in die Wells einer 96-Well Platte pipettiert, 300 µl des BCA/Kupfersulfat Reagenz hinzugegeben und die Platte bei 37°C für 30 Min inkubiert. Die Messung erfolgte bei 562 nm im Tecan Reader und die Berechnung der MPO-Aktivität der einzelnen Proben erfolgte unter Zuhilfenahme des Standards aus der Proteinbestimmung und vorausgegangener MPO-Messung.

2.2.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die unter 2.2.2 hergestellten Schnitte wurden durch zweimaliges Waschen in Xylol und nachfolgender Überführung in Ethanol mit absteigender Konzentration (100 %-, 90 %-, 80 %-, 70 %-) für jeweils 2 Min entparaffiniert und anschließend für weitere 2 Min in Aqua dest gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte für 3 Min in Mayers Hämalaun und anschließendem kurzen Eintauchen in 0,1 % HCL Lösung sowie Spülung für 5 Min unter laufendem Leitungswasser. Nun wurden die Schnitte für 3 Min in Eosin-B Lösung gefärbt und anschließend wieder für 2 Min unter laufendem Leitungswasser gespült. In aufsteigender Alkoholreihe (70 %-, 80 %-, 90 %-, 100 %- Ethanol je 1 Minute) und 2 mal 5-minütiger Verwahrung in Xylol wurden die Präparate entwässert. Zuletzt wurden die fertigen Objektträger mit Entellan und einem Deckglas eingedeckt.

2.2.9 TUNEL Färbung

Zuerst wurden die in 2.2.2 beschriebenen entparaffinierten Schnitte mit Proteinase-K Puffer für 15 Min bei 37°C angedaut und zweimal je 3 Min in PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 60 Min nach Gabe von 50 µl einer Mischung aus „Enzymesolution“ und „Labelsolution“ des In Situ Cell Death Detection Kit. Die Negativkontrollen erfuhren dieselbe Prozedur, jedoch nur mit alleiniger Gabe von „Labelsolution“. Es folgten 3 Waschschrte für 3 Min in PBS und die Kernfärbung mit Bisbenzimidlösung für 15 Min unter Lichtausschluss. Zuletzt wurden die Schnitte nochmals zweimal je drei Min in PBS gewaschen und die Präparate unter Verwendung des Dako Cytomation Fluorescent Mounting Mediums eingedeckt.

2.2.10 Mikroskopie

Mikroskopische Beurteilungen fanden unter der Verwendung des Mikroskopes Axio Imager M1 und dessen zugehöriger Software Axio Vision statt. Im Falle der HE-Färbung wurden repräsentative Bildausschnitte abfotografiert und gespeichert. Für die TUNEL-Färbung

(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) wurden geblindet gegenüber den Tiergruppen, alle TUNEL-positiven Zellen in 10 Blickfeldern bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt.

2.2.11 Statistik

Alle Daten wurden unter Verwendung von Sigma Stat und Sigma Plot auf statistische Unterschiede untersucht. Nach Bestätigung der Normalverteilung der Werte wurden als statistischer Test der One-way ANOVA (analysis of variance) gefolgt vom Student-Newman-Keuls-Test als post hoc Test durchgeführt. In Falle von nicht normal verteilten Werten wurde der Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks und der Dunn's-Test herangezogen. Bei einem Wert von $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant erachtet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Zytokine und Chemokine im Plasma

Um herauszufinden, ob die Entwicklung einer systemischen Entzündung nach Thoraxtrauma und CLP in Fas-mutierten Mäusen reduziert war, wurde die Plasmakonzentration zentraler Zytokine und Chemokine bestimmt. Hierbei kam es in Wildtyp-Tieren (DH C57) 12 und 24 Stunden nach CLP zu einem signifikanten Anstieg von IL-6 und IL-10. In Fas-mutierten Mäusen (DH FAS) hingegen war die Konzentration dieser Zytokine signifikant gegenüber den Wildtyp-Tieren erniedrigt. Die Plasmakonzentration von IL-1 β und TNF- α war 12 Stunden nach CLP tendenziell und 24 Stunden nach CLP signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Zum 24 Stunden Zeitpunkt zeigte sich in der DH FAS Gruppe eine signifikante Reduktion an IL-1 β gegenüber der Wildtyp-Gruppe (Abb. 2).

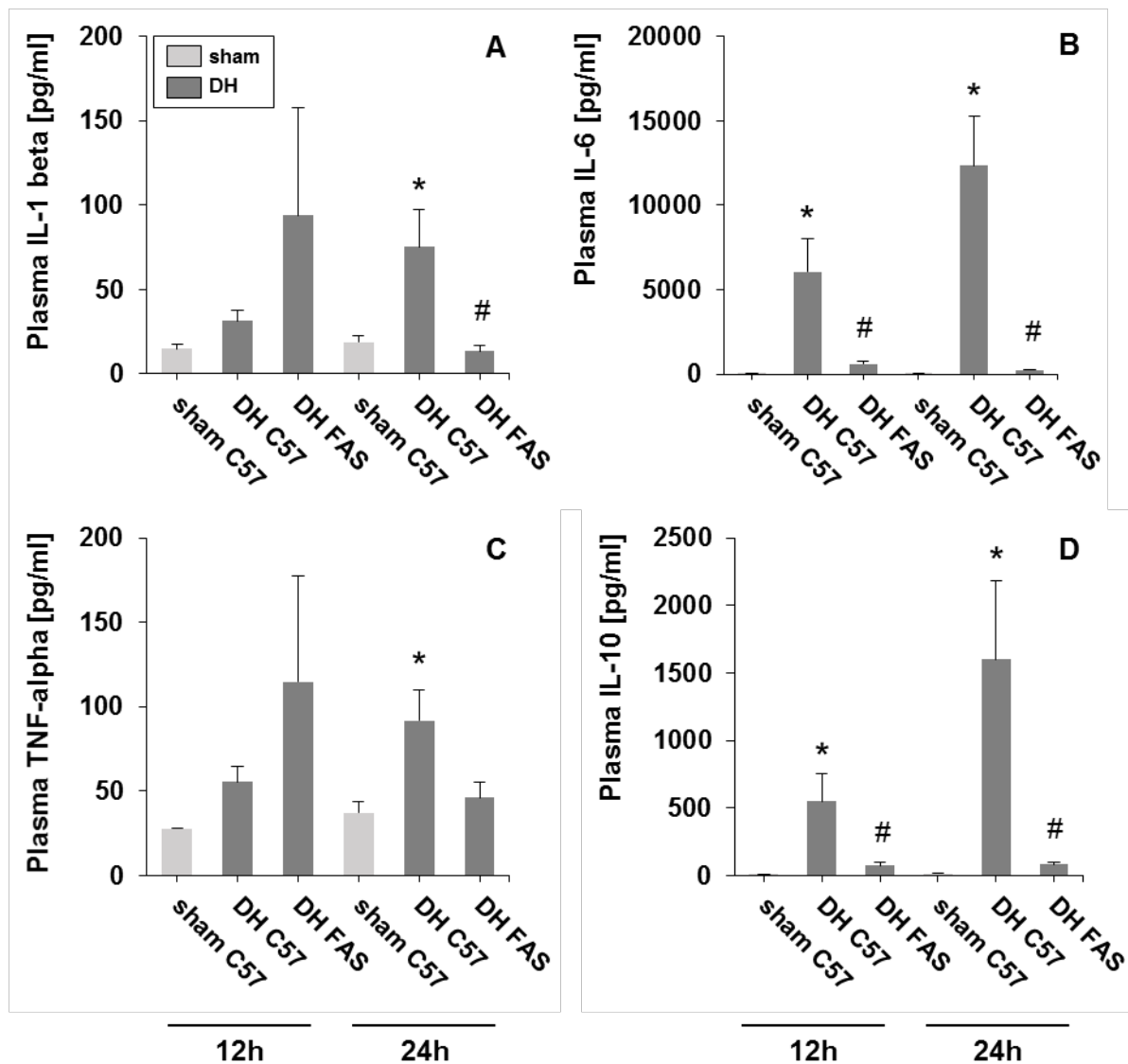


Abb. 2: Plasma-Konzentrationen von IL-1 beta (A), IL-6 (B), TNF-alpha (C) und IL-10 (D) in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 bzw. 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. * $p < 0,05$ verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); # $p < 0,05$ verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

Die Konzentration von RANTES, MIP-1 alpha und G-CSF waren in der Wildtyp-Gruppe zu beiden Zeitpunkten nach Trauma und Sepsis signifikant gegenüber den Sham-Tieren erhöht. Im Falle von G-CSF traf dies auch auf die Fas-mutierten Gruppe zu. Hingegen dazu kam es bei RANTES zum 24 Stunden Zeitpunkt und bei MIP-1 alpha zu beiden Zeitpunkten nach DH zu einer signifikant reduzierten Freisetzung in DH FAS verglichen mit den korrespondierenden DH C57 Versuchstieren. Die Konzentration von IFN-gamma war zum 12 Stunden Zeitpunkt in der DH FAS Gruppe erhöht, während es bei allen anderen Gruppen zu keinem merklichen Anstieg von IFN-gamma 12 und 24 Stunden nach CLP kam (Abb. 3).

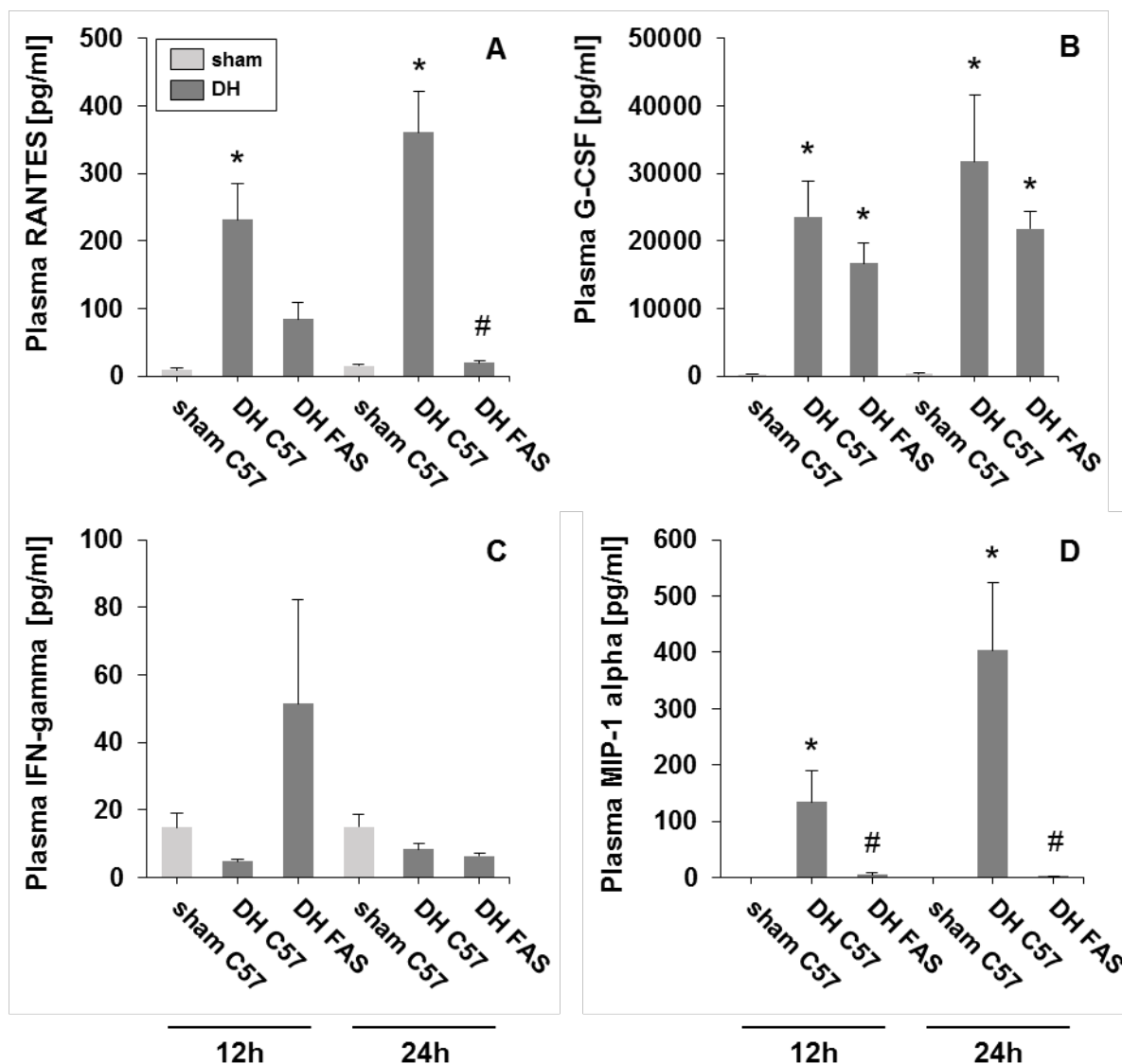


Abb. 3: Plasma-Konzentrationen von RANTES (A), G-CSF (B), IFN-gamma (C) und MIP-1 alpha (D) in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 bzw. 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. *p<0,05 verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); #p<0,05 verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

Auch die Plasmakonzentrationen von KC, MCP-1 und MIP-2 waren 12 und 24 Stunden nach TxT und CLP in der DH C57 Gruppe signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Im Vergleich dazu fand sich in den Fas-mutierten Tieren 24 Stunden nach DH für die Chemokine MCP-1 und MIP-2 eine signifikant verminderte Konzentration. Für MCP-1 war bereits beim 12 Stunden Zeitpunkt eine signifikant erniedrigte Konzentration gegenüber den Wildtyp-Tieren zu verzeichnen (Abb. 4).

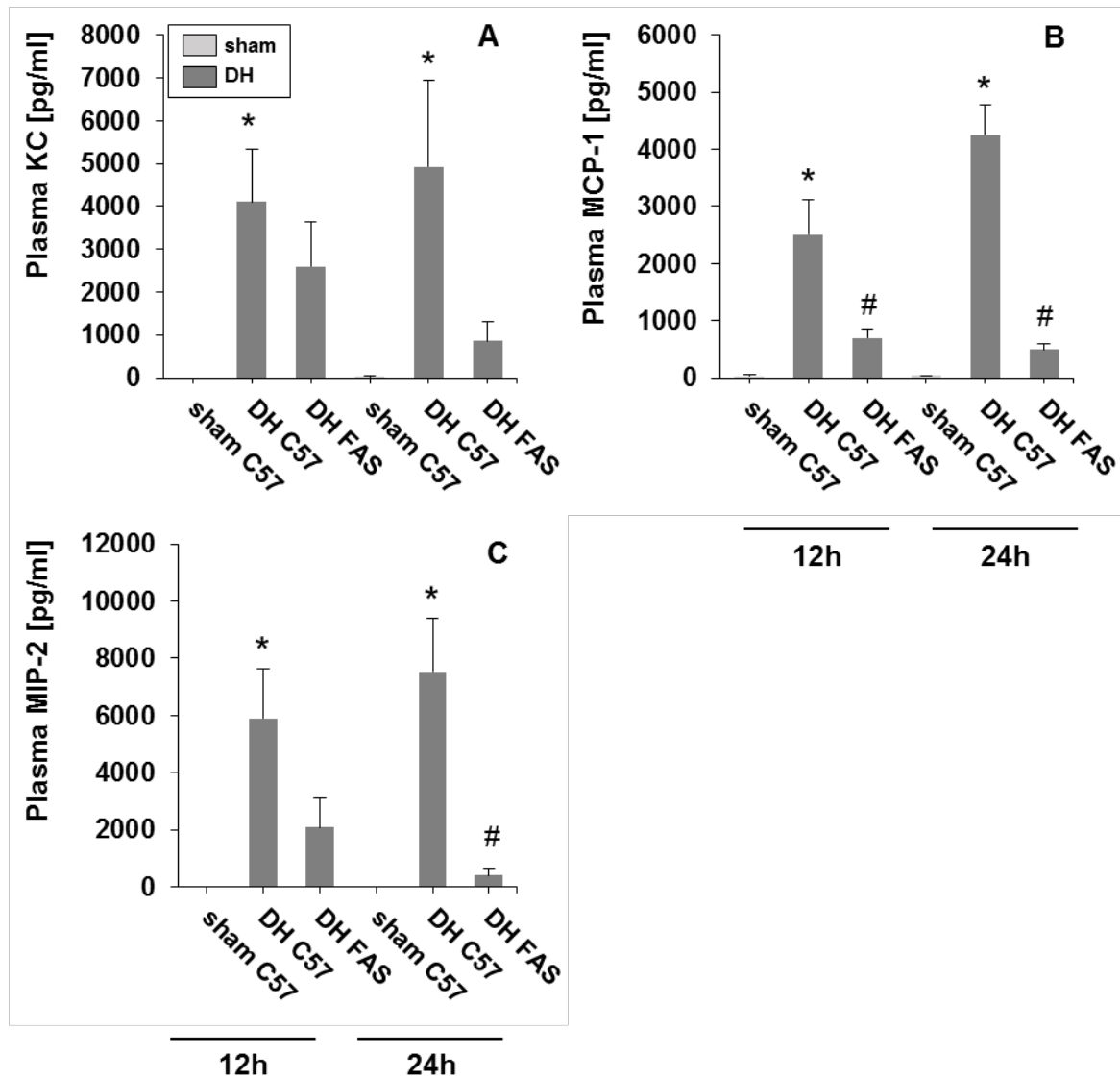


Abb. 4: Plasma-Konzentrationen von KC (A), MCP-1 (B) und MIP-2 (C) in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 bzw. 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. * $p < 0,05$ verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); # $p < 0,05$ verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

3.2 Zytokine und Chemokine in der Lunge

Um die inflammatorische Reaktion von Thoraxtrauma und Sepsis in der Lunge zu untersuchen, wurden oben genannte Zytokine und Chemokine lokal in den Lungenhomogenaten 12 und 24 Stunden nach DH bestimmt. Es zeigte sich, dass die Konzentrationen von IL-1 beta, IL-6 und IL-10 im Lungengewebe der DH C57 Gruppen sowohl beim 12 als auch beim 24 Stunden Zeitpunkt signifikant gegenüber den

Kontrolltieren erhöht waren. Für TNF-alpha waren beim 12 Stunden Zeitpunkt erhöhte Konzentrationen in beiden DH Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Bei den Fas-mutierten Tieren waren die Konzentrationen von IL-1 beta, IL-6 und IL-10 12 Stunden nach Trauma und Sepsis deutlich und 24 Stunden nach DH signifikant gegenüber den traumatisierten Wildtyptieren vermindert (Abb. 5).

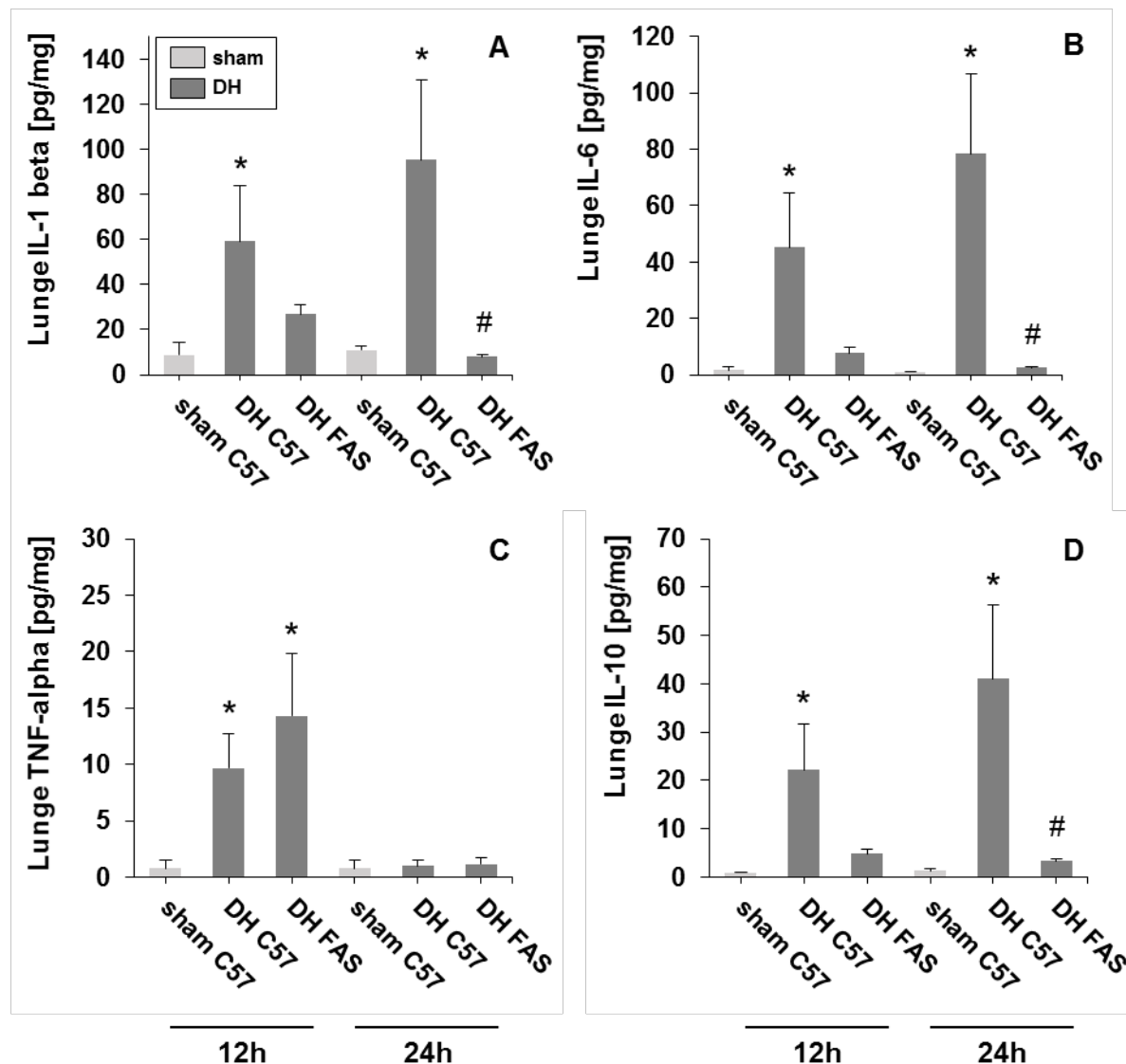


Abb. 5: Konzentrationen im Lungengewebe von IL-1 (A), IL-6 (B), TNF-alpha (C) und IL-10 (D) in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 bzw. 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. *p<0,05 verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); #p<0,05 verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

Die Bestimmung von RANTES und IFN-gamma zeigte keine signifikanten Änderungen nach Trauma und Sepsis. Für RANTES war in der DH C57 Gruppe zum 24 Stunden Zeitpunkt ein tendenzieller Anstieg zu verzeichnen. Für IFN-gamma kam es zum 12 Stunden Zeitpunkt sowohl bei der DH C57 Gruppe als auch bei der DH FAS Gruppe zu einer Konzentrationserhöhung gegenüber Sham. Die Konzentrationen von G-CSF und MIP-1 alpha waren in der DH C57 Gruppe 12 und 24 Stunden nach DH signifikant erhöht. Dagegen kam es in der DH FAS Gruppe zu einer signifikant niedrigeren Freisetzung dieser Chemokine gegenüber den C57 Tieren (Abb. 6).

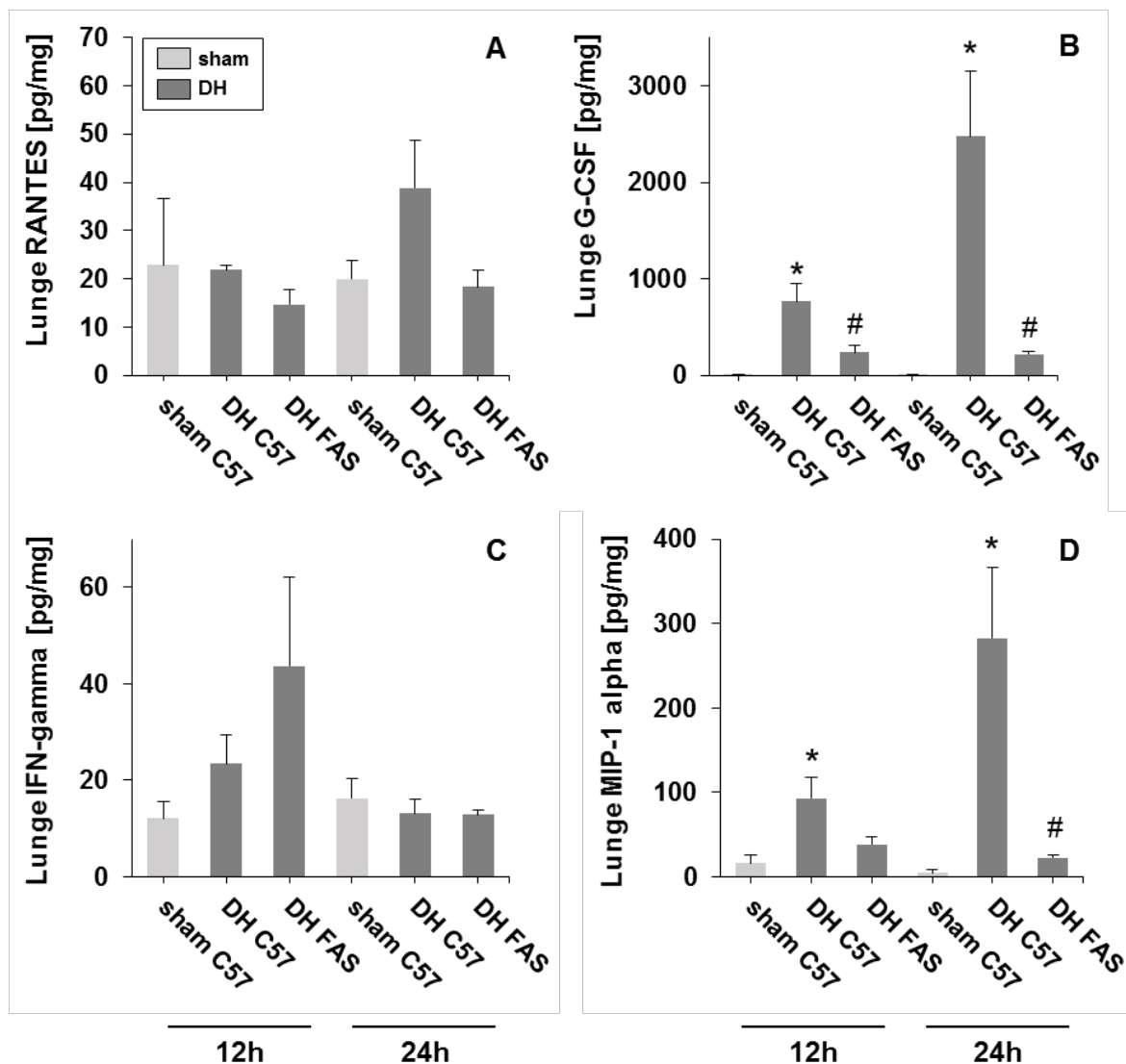


Abb. 6: Konzentrationen im Lungengewebe von RANTES (A), G-CSF (B), IFN-gamma (C) und MIP-1 alpha (D) in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 bzw. 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. *p<0,05 verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); #p<0,05 verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

Für KC und MCP-1 ließen sich zum 12 und 24 Stunden Zeitpunkt in der DH C57 Gruppe signifikant höhere Konzentration gegenüber den Sham-Tieren nachweisen. Die DH FAS Gruppe wies 24 Stunden nach DH signifikant erniedrigte Konzentrationen zur DH C57 Gruppe auf. Bei der Messung von MIP-2 kam es zu keinen relevanten Konzentrationsunterschieden beider DH Gruppen verglichen zur Sham-Kontrolle (Abb. 7).

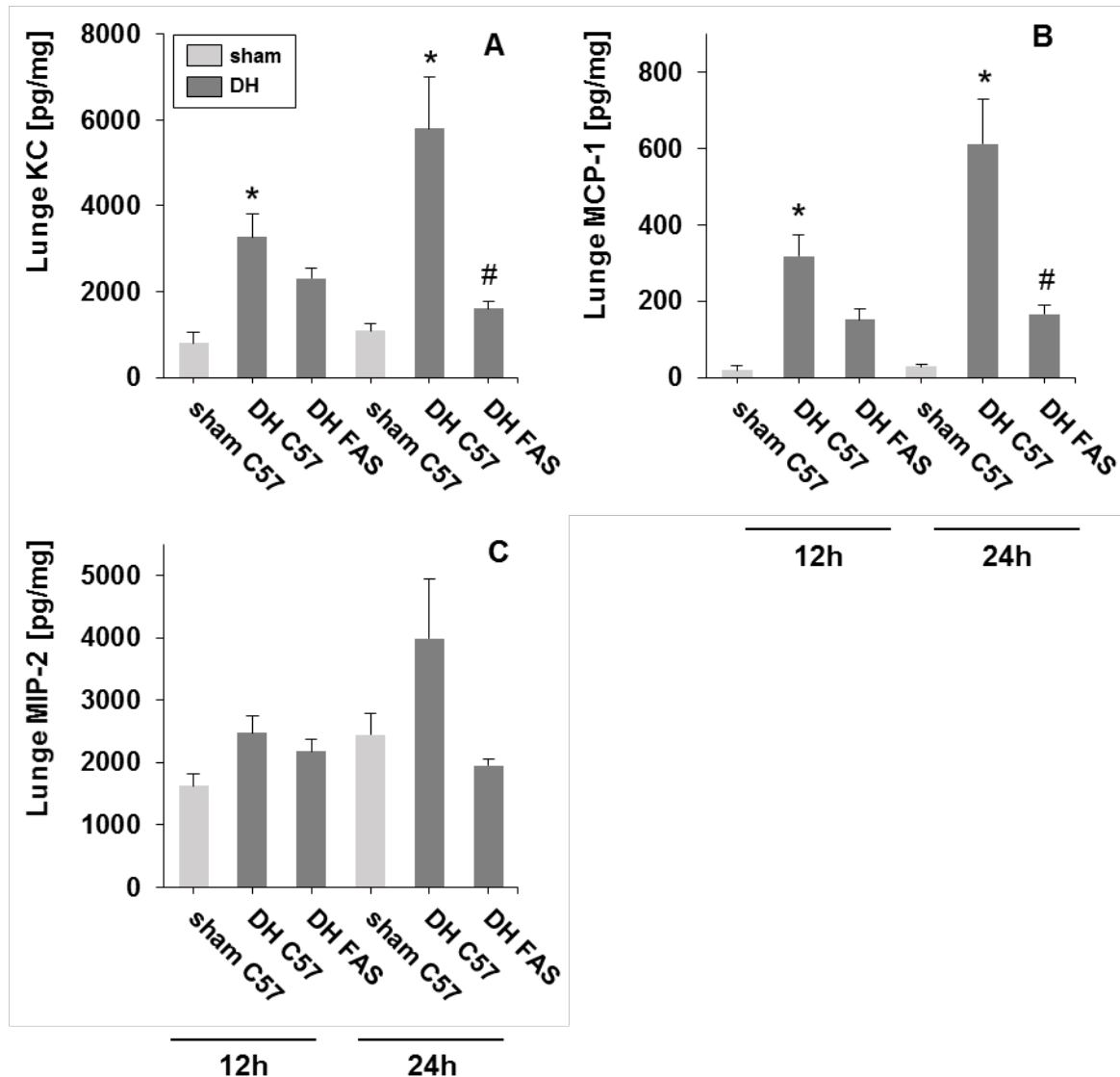


Abb. 7: Konzentrationen im Lungengewebe von KC (A), MCP-1 (B) und MIP-2 (C) in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 bzw. 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. * $p < 0,05$ verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); # $p < 0,05$ verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

3.3 Zytokine und Chemokine in der Bronchoalveolären Lavage

Die Zytokin- und Chemokin Bestimmungen in der BAL wurden zum 12 Stunden Zeitpunkt nach TxT und CLP durchgeführt. Hierbei konnte eine signifikant erhöhte Konzentration von IL-6 in der DH C57 Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe festgestellt werden. Demgegenüber waren die IL-6 Konzentrationen in der DH FAS Gruppe signifikant erniedrigt. Einen tendenziell ähnlichen Verlauf zeigte IL-10. Bei der Messung von IL-1 beta und TNF-alpha konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gemessen werden (Abb. 8).

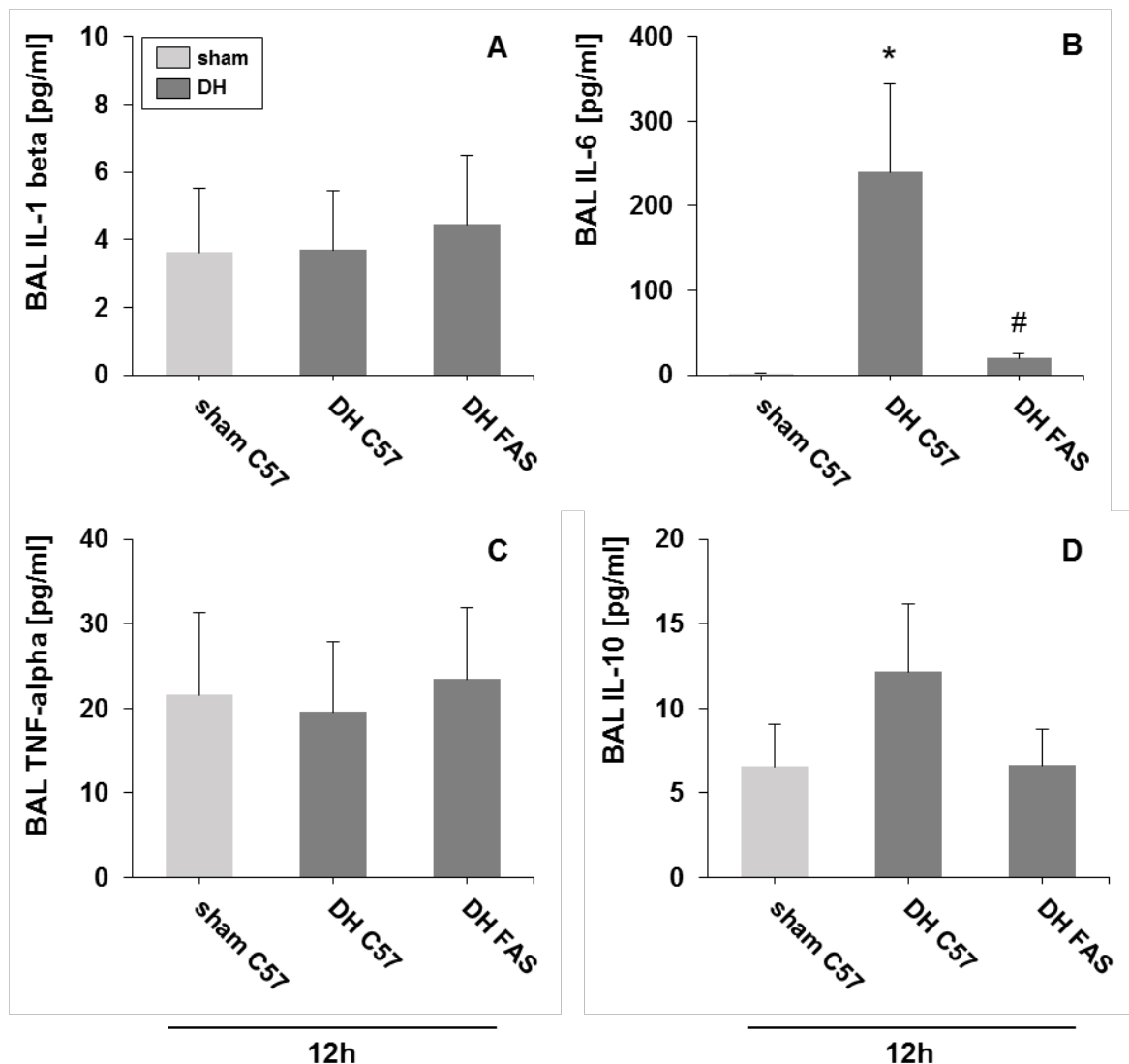


Abb. 8: Konzentrationen in BAL von IL-1 (A), IL-6 (B), TNF-alpha (C) und IL-10 (D) in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. * $p < 0,05$ verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); # $p < 0,05$ verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

Die Konzentrationsmessung von G-CSF ergab in beiden DH Gruppen (C57 und FAS) signifikant erhöhte Werte gegenüber Sham-Tieren. Die Bestimmung von RANTES in BAL lieferte signifikant erhöhte Messwerte in der DH C57 Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, was in den Fas-mutierten Tieren reduziert war. Für IFN-gamma und MIP-1 alpha Konzentrationen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden (Abb. 9).

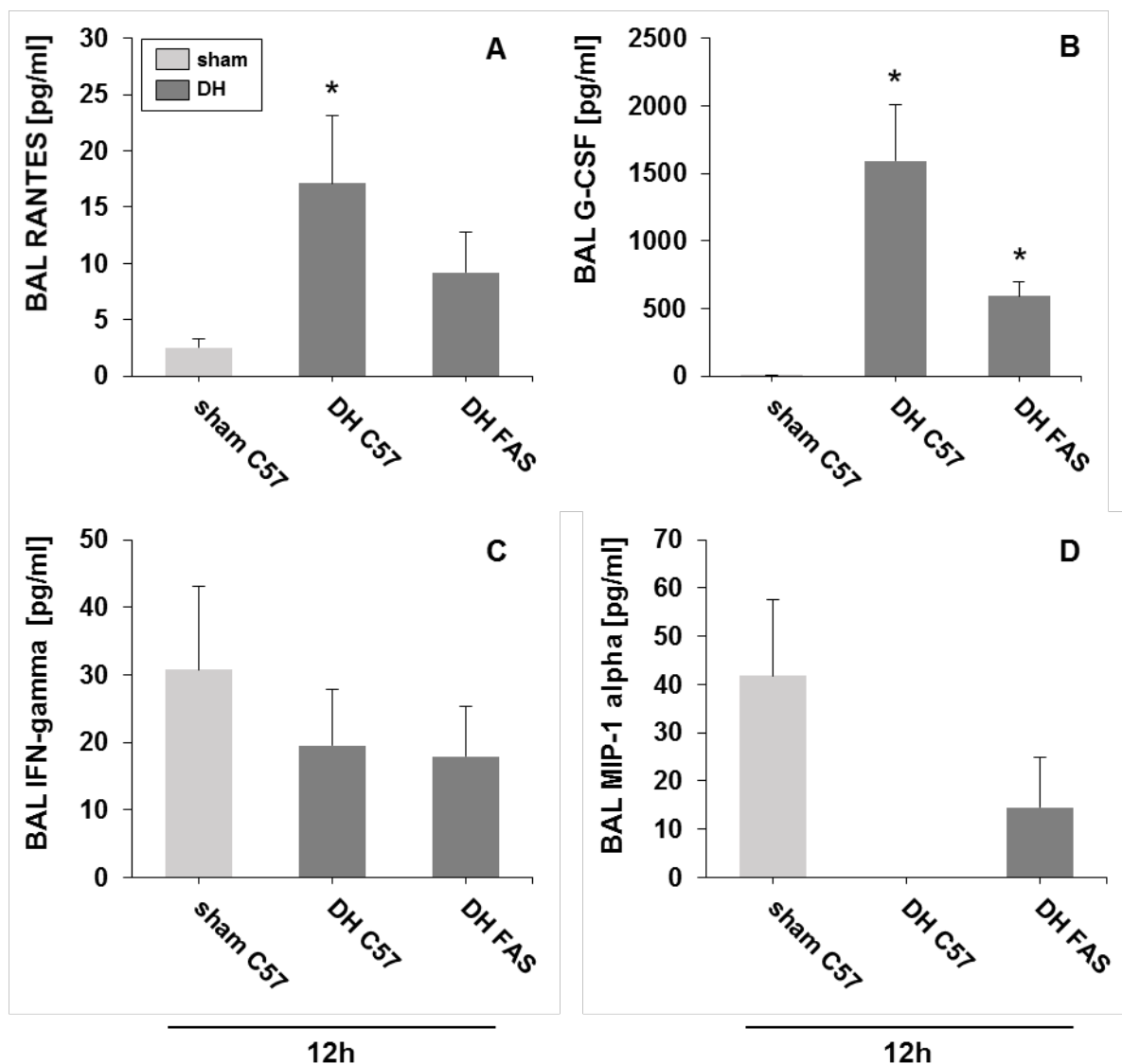


Abb. 9: Konzentrationen in BAL von RANTES (A), G-CSF (B), IFN-gamma (C) und MIP-1 alpha (D) in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. * $p < 0,05$ verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); # $p < 0,05$ verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

Die KC Konzentration in der BAL der DH C57 Gruppe war analog zum Lungengewebe signifikant gegenüber den Sham-Tieren erhöht. Bemerkenswerterweise ließ sich in der BAL eine signifikante Erniedrigung in der DH FAS Gruppe nachweisen. Bei MCP-1 konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Konzentration in den C57 Wildtyp-Tieren festgestellt werden, die in den Fas-mutierten Mäusen tendenziell erniedrigt war. Analog zur Messung im Lungengewebe kam es auch in der BAL bei der Bestimmung von MIP-2 zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 10).

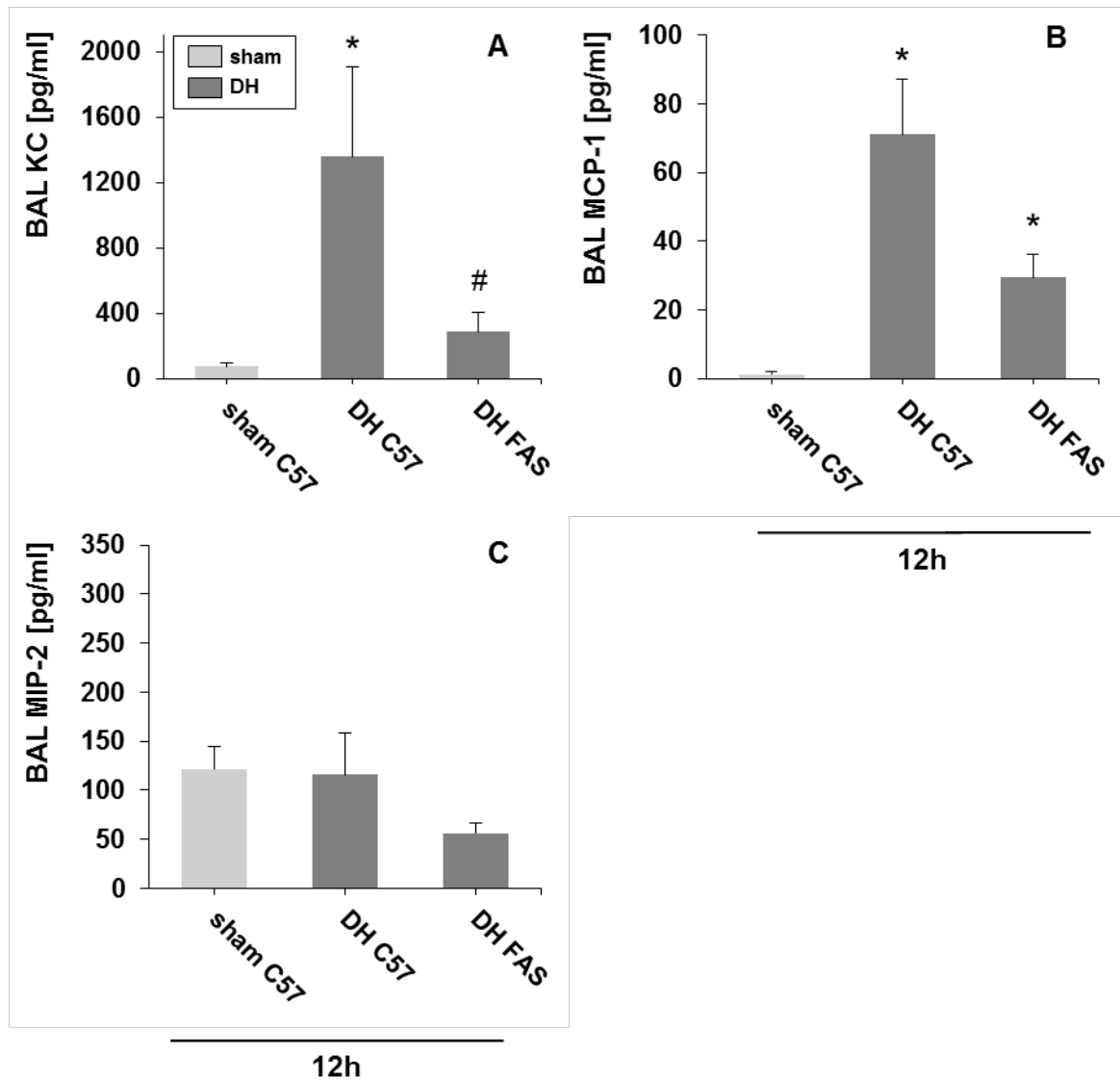


Abb. 10: Konzentrationen in BAL von KC (A), MCP-1 (B) und MIP-2 (C) in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. * $p < 0,05$ verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); # $p < 0,05$ verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

3.4 Myeloperoxidase-Aktivität im Lungengewebe

Als Maß für die Neutrophilen-Infiltration in die Lunge wurde die Myeloperoxidase-Aktivität 12 und 24 Stunden nach DH bestimmt. In den Trauma Tieren der C57 Gruppe zeigte sich zum 12 Stunden Zeitpunkt eine signifikant erhöhte MPO Aktivität gegenüber den Sham-Tieren. Die Funktionseinschränkung des Fas-Rezeptors in Fas-Rezeptor-mutierten Mäusen führte zu einer signifikant erniedrigten Aktivität gegenüber Wildtyptieren zu diesem Messzeitpunkt. 24 Stunden nach Sepsis war die gemessene MPO Aktivität in der DH C57 Tiergruppe nur marginal erhöht. Zu diesem Zeitpunkt war in den Fas-mutierten Tieren eine tendenziell erniedrigte MPO Aktivität im Vergleich zu den WT Tieren zu verzeichnen, jedoch ohne Signifikanz (Abb. 11).

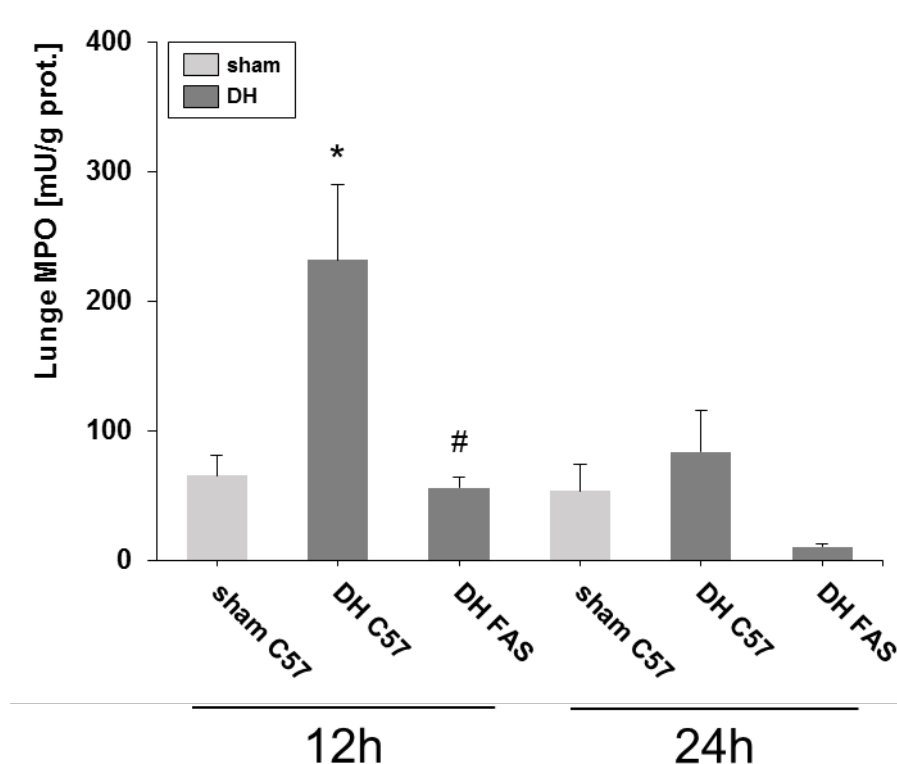


Abb. 11: Myeloperoxidase-Aktivität in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 bzw. 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. * $p < 0,05$ verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); # $p < 0,05$ verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

3.5 Permeabilitätsstörung der alveolo-kapillären Barriere

Zur Detektion von alveolo-kapillären Permeabilitätsstörungen wurde die Durchlässigkeit des Lungenepithels für Proteine aus dem Blutplasma 12 und 24 Stunden nach Thoraxtrauma und Sepsis gemessen. Wie in Abbildung 12 dargestellt, kam es 12 Stunden nach CLP zu einer signifikant erhöhten Protein-Konzentration in der BAL der DH C57 Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren, was auf eine Störung der alveolo-kapillären Integrität hindeutete. Im Gegensatz dazu war in der DH FAS Gruppe eine signifikant reduzierte Proteinmenge in der BAL gegenüber den traumatisierten Wildtyp-Tieren zu verzeichnen (Abb. 12).

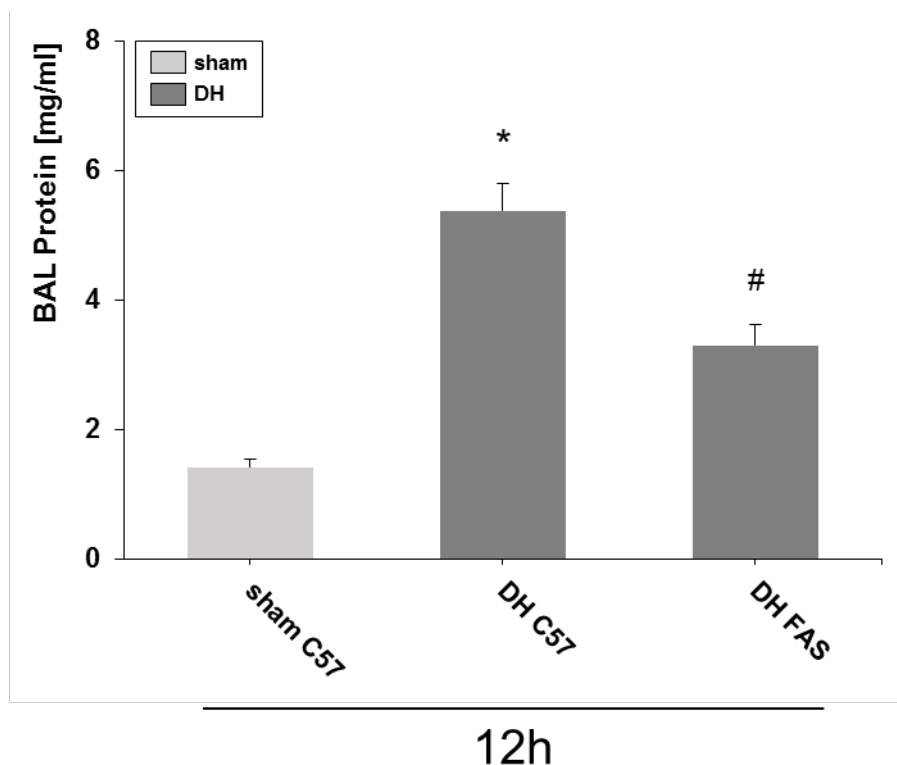


Abb. 12: Proteinkonzentration in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. * $p < 0,05$ verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); # $p < 0,05$ verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

3.6 Apoptose in der Lunge

Als Maß für die Aktivierung der Apoptosekaskade wurden Caspase 3 Western Blot Analysen in Lungenhomogenaten durchgeführt. Hierbei zeigte sich sowohl 12 als auch 24 Stunden nach Induktion der Sepsis eine erhöhte Menge an aktiver Caspase 3 in C57 Tieren

verglichen mit Sham-Tieren (Abb. 13). In der DH FAS Gruppe hingegen war die Caspase 3 Menge 12 Stunden nach TxT und Sepsis signifikant vermindert im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren nach DH (Abb. 14).

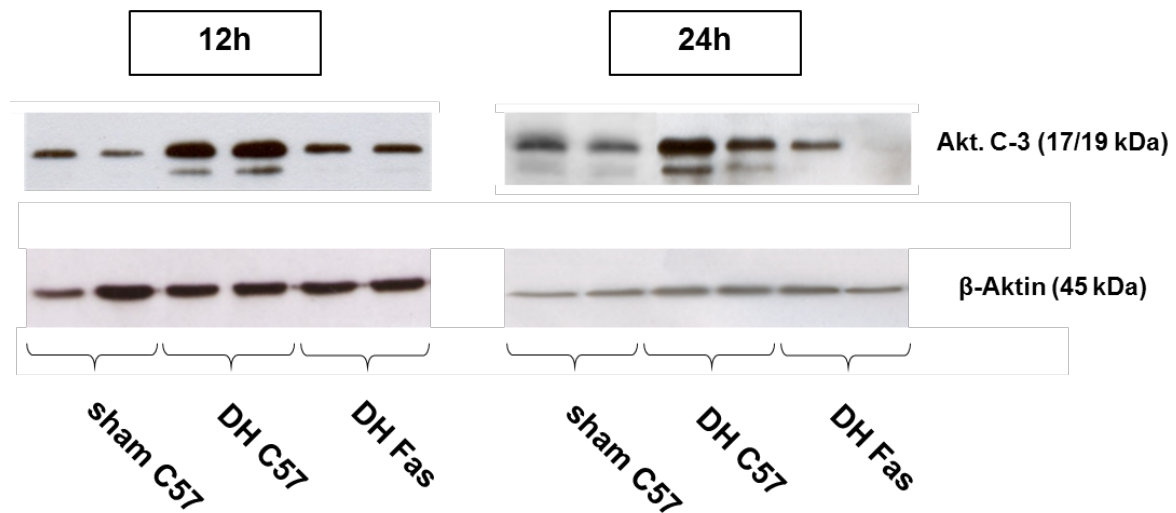


Abb. 13: Repräsentative Western Blot Analyse der Menge aktiver Caspase-3 (Akt. C-3, 17/19 kDa) im Lungenhomogenat der Versuchsgruppen 12 bzw. 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. Wildtyp (sham C57), Double-Hit Wildtyp (DH C57) und Double-Hit Fas-Rezeptor-Mutation (DH Fas) nach 12 und 24 Stunden. Zur Normalisierung dient der korrespondierende β-Actin Re-Blot (45 kDa), Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

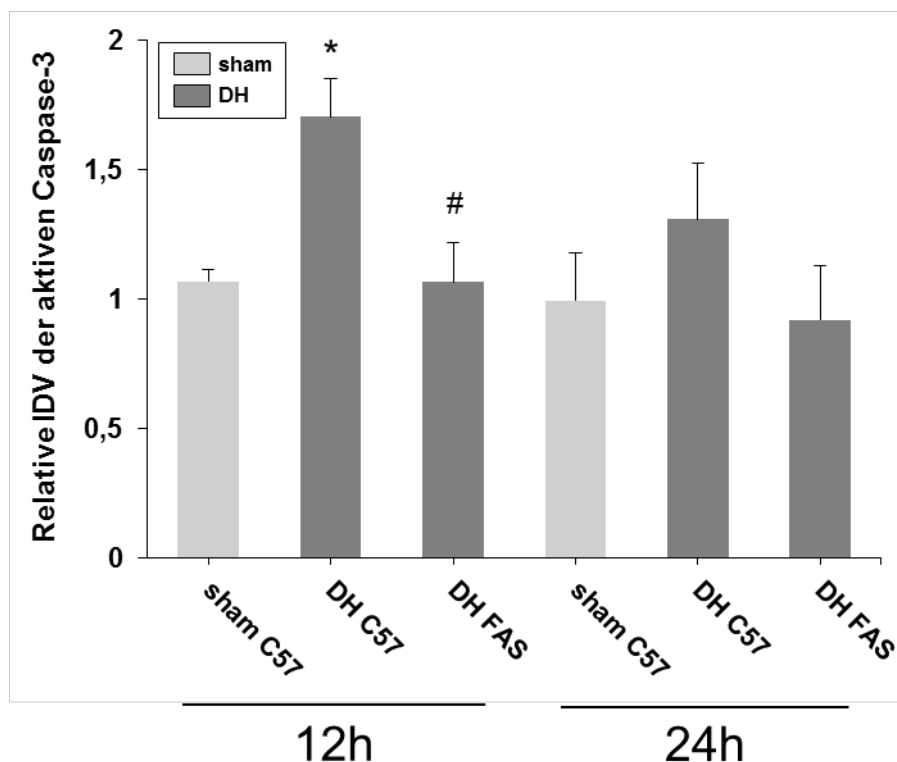


Abb. 14: Densitometrische Auswertung der Aktive-Caspase-3-Western-Blots in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 bzw. 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. * $p < 0,05$ verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); # $p < 0,05$ verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

Eine erhöhte Apoptoserate in der Lunge nach Trauma und Sepsis konnte auch durch TUNEL Färbungen bestätigt werden. Zu beiden Zeitpunkten war eine erhöhte Anzahl an TUNEL-positiver Zellen bei C57 Mäusen nachzuweisen, die sich zum 12 Stunden Zeitpunkt als signifikant gegenüber den Kontrolltieren erwies. Die DH FAS Gruppe hingegen zeigte 12 Stunden nach DH eine signifikante Reduktion TUNEL positiver Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren und es war kein Unterschied zu den Kontrolltieren zu verzeichnen (Abb.15).

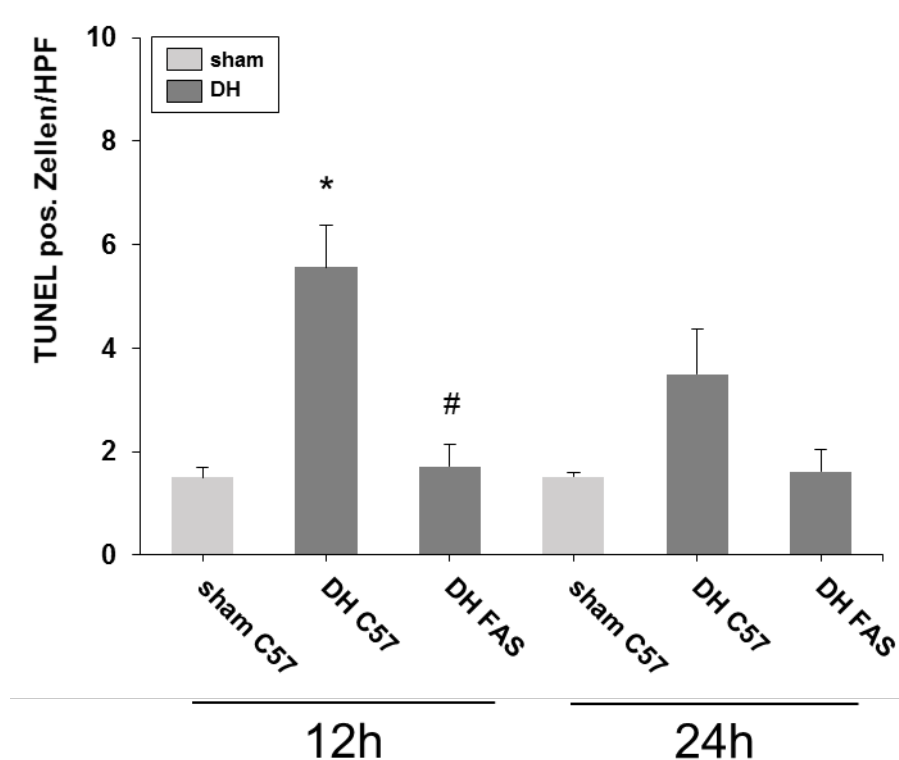


Abb. 15: TUNEL-positive Zellen pro Sichtfeld bei Auszählung von 20 Sichtfeldern in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 bzw. 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. * $p < 0,05$ verglichen mit der korrespondierenden sham-Gruppe (sham C57 12 h/24 h); # $p < 0,05$ verglichen mit korrespondierender DH C57-Gruppe (DH C57 12 h/24 h), One Way ANOVA und Student-Newman-Keuls post hoc Test. Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

3.7 Lungenhistologie

In der Zusammenschau können im hier durchgeführten Thoraxtrauma Modell mit CLP zentrale Charakteristika (systemische sowie lokale Entzündung in der Lunge mit Erhöhung der Apoptose, Neutrophilen-Infiltration und Störung der alveolo-kapillären Schranke) einer akuten Lungenschädigung hervorgerufen werden. Die gefundenen Ergebnisse spiegeln sich in den histologisch untersuchten Lungenpräparaten der verschiedenen Versuchstiergruppen wieder. Die Double-Hit Tiere wiesen charakteristische Merkmale eines Lungenschadens, wie Einblutung in Alveolen, Verdickung der Septen und Leukozyteninfiltrationen auf. Durch Mutation und Funktionseinschränkung des Fas-Rezeptors in den lpr-Tieren, zeigen sich diese ARDS-typischen Veränderungen der Lunge in deutlich reduzierter Ausprägung (Abb. 16).

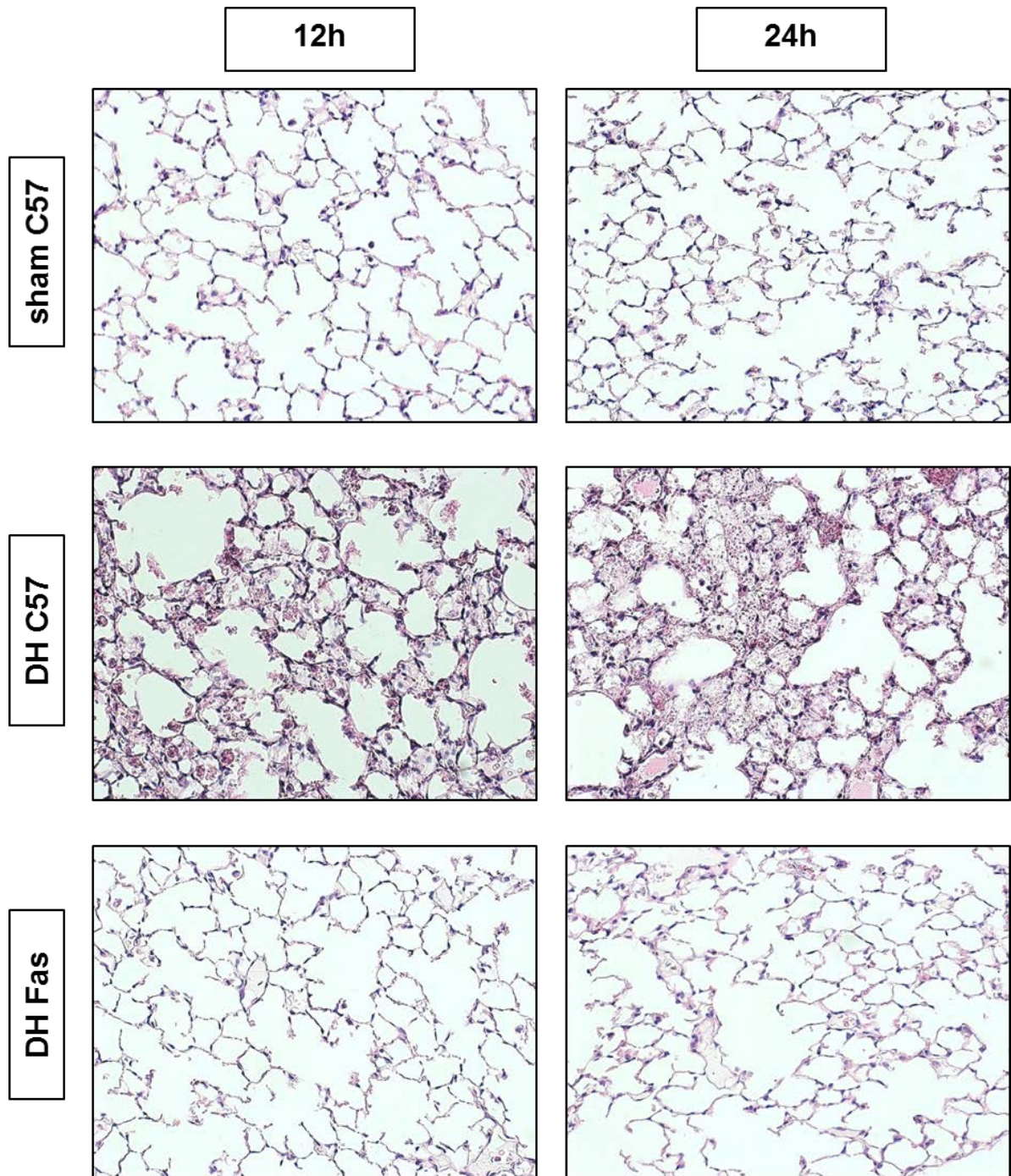


Abb. 16: Repräsentative Hämatoxylin/Eosin gefärbte Lungengewebschnitte in C57 und Fas-mutierten Tieren (FAS) 12 bzw. 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma und Sepsis (DH)- oder Kontroll (sham)-Prozedur. 400-fache Vergrößerung, Erstveröffentlichung in: [149], Änderungen der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc, Copyright © 2013, © 2013 Lippincott Williams.

4 Diskussion

Bis heute stellt das ARDS ein Krankheitsbild dar, bei dem man im klinischen Alltag schnell an therapeutische Grenzen stößt. Bisherige Behandlungsversuche beim Vollbild der Erkrankung belaufen sich meist auf supportive Maßnahmen und weniger auf interventionelle Ansätze. Die unterschiedlichen Entitäten, die zur Ausbildung des ARDS führen, sowie das inhomogene Patientenkollektiv stellen erhöhte Anforderungen an die Erforschung des Krankheitsbildes. Hinsichtlich der Pathophysiologie finden mittlerweile zwei Hypothesen in diesem Diskurs durchgehend Berücksichtigung. Zum einen soll die Schädigung des Lungenepithels von aktivierten neutrophilen Granulozyten und deren Metaboliten (Neutrophilen-Hypothese) und zum anderen von apoptotischen Prozessen der Lungenepithelzellen (Epithelzellhypothese) ausgehen und somit einen zentralen Punkt für die Pathogenese des ARDS darstellen.

Im Hinblick auf letztere scheint die Fas-Rezeptor-assoziierte Signalkaskade einen wesentlichen Beitrag zum apoptotischen Pathomechanismus beizutragen. Einerseits durch die Aktivierung der Fas-Signalkaskade, die zur direkten Aktivierung apoptotischer Vorgänge führt und andererseits durch die Fas-assoziierte Produktion inflammatorischer Mediatoren mit anschließender Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. In vorliegender Arbeit wurde in einem klinisch relevanten ARDS-Modell der Maus untersucht, welche Rolle der Fas-Rezeptor bei der Entstehung eines Thoraxtrauma-induzierten septischen akuten Lungenschadens spielt. Hierzu wurde die Entwicklung von ARDS-assoziierten Merkmalen in einem ARDS-Modell bestehend aus Thoraxtrauma und Sepsis (Double-Hit) in Wildtyp-Mäusen mit Fas-Rezeptor-mutierten Mäusen verglichen.

4.1 Systemische und lokale Immunantwort

Zunächst wurde durch die Bestimmung zentraler Zytokine und Chemokine im Plasma die Entstehung einer systemischen Entzündung nach Thoraxtrauma und Sepsis untersucht. Dabei zeigte sich, dass es in Wildtyp-Tieren 12 und 24 Stunden nach DH zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von IL-6, IL-10, RANTES, G-CSF, MIP-1 alpha, KC, MCP-1 und MIP-2 im Plasma gegenüber Kontrolltieren kam. Für TNF-alpha und IL-1 beta konnten 24 Stunden nach CLP erhöhte Werte gefunden werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es im vorliegenden Modell bereits frühzeitig zu einer starken systemischen Immunantwort kam. Auch bereits veröffentlichte Daten über die Etablierung des hier verwendeten Tiermodells spiegeln diese Ergebnisse wider [121]. Viele Tiermodelle des septischen akuten Lungenschadens basieren jedoch nur auf einen „Single Hit“, wie zum

Beispiel die alleinige Induktion einer Sepsis durch CLP oder mittels LPS bzw. Bakterien-Applikation [97]. Diese Modelle sind jedoch mit der Problematik konfrontiert, dass sie nur unzureichend die pathologischen Prozesse bei Patienten mit Entwicklung eines ARDS nachahmen. Die intravenöse LPS Injektion führt zwar zu einer frühen systemischen und lokalen Immunantwort mit Apoptose in endothelialen Zellen, eine Infiltration von PMN in die Lunge bleibt jedoch weitgehend aus [42,151]. Fox-Dewhurst et al. zeigte, dass die intratracheale Applikation von bakteriellem Fäzes eher zur Ausbildung einer Pneumonie als zu einem ARDS mit niedriger Rekrutierung an neutrophilen Granulozyten und Ausbleiben einer Dysfunktion der alveolo-kapillären Schranke führte [41]. Die in zahlreichen Veröffentlichungen verwendeten Double-Hit-Modelle (Schock + CLP, Intratracheale Bakterienapplikation + Rauchinhalation, Thoraxtrauma + CLP) imitieren die klinische Relevanz des ARDS wesentlich besser [7,109,121]. Somit kann die Verwendung eines kombinierten klinisch relevanten Double-Hit-Modells besser dazu beitragen, die dynamischen Prozesse der Lungenschädigung, die im Patienten ablaufen, zu verstehen und zu erforschen [94,126].

Speziell in der Pathogenese des ARDS im Menschen spielen IL-1, IL-6, IL-8 und TNF-alpha eine bedeutsame Rolle bei der Exazerbation der Lungenschädigung [146]. Hinzu kommt begleitend eine erhöhte Konzentration von IL-1, IL-6, G-CSF und TNF-alpha im Rahmen eines Systemischen Inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) [16,17,29]. Zudem wurde eine erhöhte Sekretion von IL-8 (humanes Homolog zu KC und MIP-2 in der Maus) als Antwort auf eine FasL Exposition in bronchialen Epithelzellen beschrieben [50]. Auch humane Makrophagen produzieren IL-8 nach Inkubation mit einem Fas-Liganden [114]. In vorliegender Arbeit konnte durch die Funktionseinschränkung des Fas-Rezeptors im Fas-lpr Mausstamm signifikant erniedrigte Konzentrationen von IL-6, IL-10 IL-1 beta, RANTES, MIP-1 alpha, KC, MCP-1 und MIP-2 24 Stunden nach DH und von IL-6, IL-10, MIP-1 alpha und MCP- 12 Stunden nach DH im Plasma nachgewiesen werden. Der Fas-Signaltransduktionsweg scheint deshalb maßgeblich an der systemischen Produktion dieser Zytokine/Chemokine beteiligt zu sein. Vorangegangene Untersuchungen decken sich mit diesen Ergebnissen. So konnten Neff et al. in einem Modell mit direkter akuten Lungenschädigung ebenfalls eine verminderte Produktion von KC und MIP-2 bei nicht funktionsfähigem Fas-Rezeptor nachweisen [110].

Interessanterweise führte eine fehlende Fas-Aktivierung zu keiner systemischen, sondern nur zu einer lokalen Expression von G-CSF nach Trauma. Die G-CSF Konzentration im

Plasma bei Fas-lpr Mäusen sowie in Wildtyp-Tieren war signifikant gegenüber der Sham-Gruppe erhöht. Hingegen wurde im Lungengewebe eine signifikant erniedrigte G-CSF Konzentration in Fas-mutierten Tieren gegenüber Wildtyp-Tieren nach DH gemessen. In einer vorausgegangenen Studie durch Perl et al. wurde durch Depletion neutrophiler Granulozyten ebenfalls die Konzentration von G-CSF lokal in der Lunge, nicht jedoch systemisch im Blutplasma erniedrigt [121]. Ein Grund hierfür könnte eine kompensatorisch gesteigerte systemische Produktion von G-CSF als Reaktion auf eine lokal verminderte Infiltration von Neutrophilen in das Lungengewebe sein.

Analog zu den Messergebnissen im Plasma, fanden sich vergleichbare Ergebnisse im Lungengewebe. Zu beiden Zeitpunkten nach DH wurden signifikant erhöhte Werte für IL-1 beta, IL-6, IL-10, G-CSF, MIP-1 alpha, KC und MCP-1 in der DH C57 Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe nachgewiesen. Dies bestätigten auch die bisher zum Modell publizierten Ergebnisse [121]. In Fas-Rezeptor-mutierten Tieren waren die Konzentrationen von IL-1 beta, IL-6, IL-10, MIP-1 alpha, KC und MCP-1 24 Stunden nach DH und im Falle von G-CSF zusätzlich zum 12 Stunden Zeitpunkt signifikant vermindert. In einem indirekten ARDS Tiermodell mit CLP- und Hämorrhagie-vermitteltem Lungenschaden wurden ebenfalls verminderte Konzentrationen an KC, MCP-1 und MIP-2 in Fas-depletierten Tieren gegenüber Kontroll-Mäusen 12 Stunden nach dem „second Hit“ gemessen [118]. Dass dies im vorliegenden Modell erst 24 Stunden nach TxT und CLP auftrat, könnte durch den hier induzierten direkten Lungenschaden (ausgelöst durch ein TxT) mit mechanisch bedingter Zerstörung von Lungengewebe erklärt werden. Dadurch könnte es in der Lunge Fas-unabhängig zu einer verstärkten frühen inflammatorischen Reaktion kommen, so dass eine fehlende Fas-Aktivierung hier noch keine Wirkung entfalten könnte. Dies würde auch erklären, weshalb die Plasmakonzentrationen von KC und MIP-2 zum 12 Stunden Zeitpunkt in beiden Versuchstiergruppen nicht signifikant unterschiedlich waren.

Bei der Bestimmung von RANTES war ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zum 24 Stunden Zeitpunkt im Plasma detektierbar, im Lungenhomogenat jedoch war kein Unterschied feststellbar. Bei TNF-alpha war die Konzentration im Lungengewebe 12 Stunden nach CLP in beiden Gruppen erhöht und zum 24 Stunden Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Im Plasma hingegen kam es zu einer signifikanten Erhöhung in der DH C57 Gruppe 24 Stunden nach DH. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Messergebnisse zwischen Plasma und Lungenhomogenat könnte in der Kinetik der beiden Zytokine liegen. So stellte auch Bosmann et al. eine rasche Konzentrationsabnahme von TNF-alpha im Plasma von Mäusen eine Stunde nach intratrachealer oder intraperitonealer

LPS-Injektion fest [15]. Im selben Experiment zeigte sich ein ähnliches Bild für die Bestimmung von RANTES. Die Konzentration stieg 6 Stunden nach intraperitonealer LPS-Injektion rasch an und war nach 24 Stunden bereits um die Hälfte abgesunken, wohingegen nach intrapulmonaler LPS-Instillation die Konzentration von RANTES in BAL sukzessive anstieg und nach 18 Stunden am Höchsten war. Ein Erklärungsansatz dafür wäre, dass eine Vielzahl möglicher Variationen und Phänotypen an Toll-Like-Rezeptor-exprimierenden Immunzellen in der Lunge verglichen mit anderen Kompartimenten bestehen und somit substantielle Unterschiede in der lokal gemessenen Konzentration der Analyten auftreten können [25].

In der BAL ließen sich signifikant erhöhte Konzentrationen an IL-6, KC, MCP-1 und G-CSF in DH C57 Tieren im Vergleich zur Sham-Gruppe nachweisen. Kiehl et al. konnte ebenfalls erhöhte Konzentrationen an IL-6 und IL-8 in der BAL von humanen Patienten im Rahmen eines vorliegenden ARDS nachweisen [71]. Selbiges wurde in einer Studie von Lee et al. [82] und Goodman et al. [44] beobachtet, in der erhöhte Konzentrationen an G-CSF und IL-8 bzw. MCP-1 gemessen wurden. Somit verdeutlichen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass das angewandte Mausmodell das humane ARDS Krankheitsbild bezüglich der posttraumatischen Inflammation gut abbildet. Bei den Fas-Rezeptor-mutierten Tieren konnten signifikant verminderte Konzentrationen an IL-6 und KC gegenüber Wildtyp-Tieren gemessen werden. MCP-1 und G-CSF waren in Fas-lpr Tieren tendenziell, jedoch nicht signifikant vermindert. Da bei ARDS Patienten erhöhte IL-6 [71] und G-CSF [82] Konzentrationen in der BAL mit einer schlechteren Prognose korrelieren, scheint das Ausmaß der Entzündung in der Lunge einen entscheidenden Faktor im Krankheitsverlauf des ARDS zu spielen. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie unter anderem IL-8, IL-6 und TNF-alpha erfolgt nach Fas-Aktivierung über ERK-1/2, JNK und NFκB [3,39,40,76,114,120]. Dementsprechend wurde in klinisch relevanten ARDS-Modellen nach Blockade der Fas-Signaltransduktion die pulmonale Entzündungsreaktion (gemessen an IL-8, IL-6 und TNF-alpha im Lungengewebe) nach Trauma (Hämorrhagie + CLP, intratracheale LPS-Instillation) im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant herabreguliert [74,103,118]. Vorliegende Ergebnisse zeigen deutlich, dass durch den funktionseingeschränkten Fas-Rezeptor sowohl die systemische, vor allem aber die lokale Entzündungsreaktion in der Lunge als Zeichen einer akuten Lungenschädigung signifikant vermindert wurde.

4.2 Pulmonale Neutrophilen-Infiltration

Unter infektiösen Bedingungen erfüllen neutrophile Granulozyten eine unterstützende Funktion bei der Beseitigung zahlreicher pathogener Erreger. So resultierte die Depletion von PMN im Rahmen einer experimentellen durch *Streptococcus Pneumoniae* ausgelösten Pneumonie in einer fehlenden Produktion von bakterizider Granulozyten-Elastase (ELA-2) und Cathepsin G und führte demnach zu einem Überwuchs an Bakterien mitsamt folgeschwerem Krankheitsverlauf [51]. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Überlebensrate von Neutrophilen-depletierten Mäusen bei einer *Staphylococcus Aureus*-induzierten Pneumonie signifikant geringer im Vergleich zu immunkompetenten Stämmen war [130].

Jedoch kann die unkontrollierte Proliferation und Migration dieser im Grunde mikrobiziden Zellen in das Lungengewebe ebenfalls eine Zerstörung des Parenchyms induzieren und so zur Ausbildung eines ARDS führen [48]. Klinisch ist eine hohe Neutrophilen Konzentration in der BAL mit einer schlechten Prognose bei ARDS Patienten assoziiert [116]. Ebenso wurde als Folge einer direkten Stimulation mittels eines Fas-aktivierenden Antikörpers in der Lunge von Mäusen eine erhöhte MPO-Aktivität beschrieben, die aus einer vermehrten PMN Infiltration hervorging [98]. In vorliegender Studie konnte 12 Stunden nach DH eine signifikant erhöhte MPO Aktivität im Lungengewebe der DH C57 Gruppe als Marker für die Infiltration der PMN in die Lunge nachgewiesen werden. Auch Perl et al., konnte zum 12 Stunden Zeitpunkt eine erhöhte MPO-Aktivität in C57/BL 6 Mäusen nach Thoraxtrauma und CLP nachweisen [121]. Analog ließen sich zu selbigen Zeitpunkt erhöhte Konzentrationen an G-CSF und MCP-1 in der Lunge von DH C57 Tieren detektieren. Sowohl G-CSF als auch MCP-1 wurden als potente Induktoren der Neutrophilen-Infiltration beschrieben [2,56,136]. Für MIP-2 und KC wurde ebenfalls eine tragende Rolle bei der Infiltration von aktivierten neutrophilen Granulozyten im Rahmen eines hämorrhagisch-induzierten septischen ALI Modells dargelegt [87]. Daraus lässt sich schließen, dass neben G-CSF weitere Zytokine wie MCP-1, MIP-2 und KC bei der Rekrutierung von PMN beteiligt sind. Die Konzentrationen von G-CSF im Lungengewebe, MIP-2 im Plasma, KC im Plasma, Lungengewebe und BAL sowie die Konzentration an MCP-1 im Plasma und Lungengewebe waren nach DH in der Fas-Rezeptor-mutierten Gruppe vermindert. In Zusammenschau mit der zum 12 Stunden Zeitpunkt erniedrigten MPO Aktivität lässt sich schlussfolgern, dass durch die fehlende Fas-Aktivierung eine lokale Entzündungsreaktion sowie Produktion von Entzündungsmediatoren verringert ist und die pulmonale PMN-

Infiltration mit konsekutiver Lungenschädigung abgeschwächt wird. Andere Studien können diese Beobachtung bestätigen. Dementsprechend bewirkte die intratracheale, postexpositionelle Instillation von Fas-siRNA eine verringerte MPO-Aktivität in der Lunge im indirekten ARDS Modell [118] und eine erniedrigte Zellzahl an neutrophilen Granulozyten in der BAL nach TxT und CLP [105]. Desweiteren führte die ebenfalls mittels siRNA-vermittelte Herabregulation von MIP-2 zu einem verminderten Zustrom an aktivierten PMN bei Hämorrhagie-induziertem ARDS [87]. Diese Beobachtung konnte jedoch nicht bei Verwendung einer KC-siRNA reproduziert werden und führte zu keiner reduzierten MPO-Aktivität im Plasma. Ein Grund hierfür liegt am ehesten darin, dass durch ein siRNA-Silencing keine vollständige Herabregulation der KC-Expression im Gegensatz bei ausbleibender Fas-Aktivierung erreicht wird.

Eine Depletion von Neutrophilen Granulozyten ist in den jeweiligen Modellen eines Thoraxtrauma-induzierten septischen ARDS und intratrachealer Instillation eines Fas-aktivierenden Antikörpers mit einer signifikanten Reduktion des Lungenschadens assoziiert (nachgewiesen durch verringerter Gewebskonzentration an G-CSF und intakter Lungenhistologie nach Trauma) und bestätigt somit eine pathophysiologisch relevante Rolle für aktivierte PMN bei der Ausbildung des Lungengewebes Schadens [20,121]. Interessanterweise konnte dadurch gezeigt werden, dass PMN im Rahmen eines ARDS eine schädigende Wirkung einnehmen, wohingegen sie unter infektiösen Bedingungen zur Beseitigung von Fremderregern, eine protektive Rolle innehaben [119]. Jedoch kann die Neutrophilen-Infiltration nicht allein für die Entstehung eines ARDS verantwortlich gemacht werden [153].

4.3 Apoptose

Neben einer verstärkten Inflammation und Neutrophilen-Infiltration ist auch die erhöhte Apoptoserate in der Lunge als Pathomechanismus bei der Entstehung des ARDS beschrieben [9,12,122,141]. Auch für die American Thoracic Society ist der Nachweis apoptotischer Prozesse eine Voraussetzung bei der Verwendung von ARDS-Tiermodellen [95]. In indirekten wie auch direkten ARDS Modellen zeigte sich eine erhöhte apoptotische Aktivität im Lungengewebe nach dem jeweiligem Trauma [120,121]. Dies wurde auch in vorliegendem Modell bestätigt. 12 Stunden nach DH wurde eine deutlich erhöhte Menge an aktiver Caspase 3 mittels Western Blot detektiert. Darüber hinaus war die Anzahl TUNEL-positiver Zellen in Wildtyp-Tieren signifikant gegenüber Kontrolltieren erhöht. In Fas-mutierten Tieren hingegen, wurde zum selben Zeitpunkt eine signifikant reduzierte Caspase-

3 Aktivität und Anzahl TUNEL-positiver Zellen gegenüber den Wildtyp-Tieren gemessen. Einerseits deutet dies darauf hin, dass über den Fas-Signalweg eine Caspase-3 vermittelte Apoptose abläuft. Andererseits wird dadurch gezeigt, dass dieser einen entscheidenden Einfluss auf die Apoptose im Rahmen des verwendeten ARDS-Modells hat. So zeigte sich bisher, dass die direkte Aktivierung des Fas-Signalweges *in vivo* zur Apoptose von alveolären Epithelzellen führt [98,99,102]. Im Gegensatz dazu konnte durch eine Herabregulation der Fas-Expression die pulmonale Apoptose vermindert und der Gesamtschweregrad der ALI in einem direkten [110] und indirekten ARDS Modell vermindert werden [118]. Ebenso zeigten sich in Fas-Rezeptor-mutierten Tieren bei *Legionella Pneumophila*-induzierter Pneumonie eine verminderte pulmonale Apoptose und insgesamt ein protektiver Effekt hinsichtlich der Überlebensrate [139].

Die Fas-Kaskade scheint nicht alleine ursächlich für den apoptotischen Untergang der Lungenepithelzellen im hier verwendeten Double-Hit Modell zu sein. Dies zeigt sich u.a. daran, dass in Abwesenheit der Fas Signaltransduktion keine vollständige Inhibition der Effektor Caspase erreicht wurde. Diesbezüglich ist bekannt, dass über andere Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie, insbesondere den TNFR-1 ebenfalls Fas-unabhängige apoptotische Prozesse vermittelt werden können. Weckbach et al konnte dessen Einfluss im hier verwendeten Double-Hit Modell aufzeigen. TNFR-1-Knockout Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vermindert pulmonale Apoptose nach Trauma [149]. Caspase-8 und TUNEL-positive Zellen waren intrapulmonal deutlich vermindert in TNFR-1-Knockout Mäusen gegenüber Wildtyp-Tieren nach intratrachealer Instillation von Salzsäure [117].

Desweiteren wäre auch eine Aktivierung der intrinsischen pro-apoptotischen Signalkaskade denkbar. Diese wurde bereits in Hyperoxie-, Hypoxie- und LPS-vermittelten ARDS-Modellen beschrieben. Die Hyperventilation mit 100%-Sauerstoff von Mäusen resultierte in einer erhöhten Produktion von u.a. Bid und Proteinen der Bax-Familie, die maßgeblich an intrinsischer Apoptose beteiligt sind [52]. Unter gleichen Bedingungen kommt es zur Aktivierung von Bax auf der mitochondrialen Membran und einer Freisetzung von Cytochrom C in einer alveolären Zelllinie der Ratte [21]. Isolierte Alveolar-Typ II Zellen der Ratte zeigen eine gesteigerte Apoptoserate wenn sie unter hypoxischen Umgebungsbedingungen kultiviert werden und produzieren vermehrt proapoptotisches Bnip3L, ein Protein aus der Bcl-2-Familie [77]. LPS-Stimulation von humanen alveolären Epithelzellen steigerte die mitochondriale Cytochrom C Freisetzung und Bildung von Caspase-9 und Caspase-6 [28]. Zusätzlich kommt auch der Granzyme-B-vermittelte Signalweg als Auslöser für die Apoptose von Lungenepithelzellen infrage. In diesem

Zusammenhang wurde gezeigt, dass dieser Fas-abhängig über die Aktivierung von Caspasen zur Schädigung von Lungenepithelzellen im LPS-induziertem ARDS Modell der Maus führte [74].

Somit scheinen neben dem Fas-Signalweg auch andere Signalkaskaden eine Rolle bei apoptotischen Prozessen in ARDS-Modellen spielen, wenn auch der Fas-vermittelte Anteil am programmierten Zelltod einen wesentlichen und therapeutisch relevanten Effekt im vorliegenden ARDS-Modell darstellt.

4.4 Störung der Alveolo-kapillären Barriere

Ein wesentliches zentrales Kriterium für das Vorliegen eines ARDS ist nach aktueller Definition auch das Vorhandensein eines alveolären Ödems durch eine erhöhte Permeabilität der alveolo-kapillären Membran maßgeblich [14,37,95,129]. Da eine erhöhte Durchlässigkeit des Lungenepithels für Proteine ein Anzeichen für die Störung der alveolo-kapillären Integrität darstellt, wurde in vorliegender Studie die Proteinmenge in der BAL bestimmt. Dabei zeigte sich nach Thoraxtrauma und Sepsis in Wildtyp-Mäusen eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration in der BAL im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bereits veröffentlichte Arbeiten zeigten unter Verwendung desselben Tiermodells für ARDS ebenfalls eine Schrankenstörung durch Nachweis erhöhter Proteinkonzentrationen in BAL nach Trauma und CLP [105,121]. Gleiches gilt auch für Untersuchungen mittels eines indirekten ARDS Modells. Es zeigte sich ein alveolärer Einstrom an proteinreicher Flüssigkeit bei den Tieren, die eine Double-Hit Prozedur bestehend aus hämorrhagischem Schock und CLP erhielten. Dies wurde nachgewiesen durch ein erhöhtes BAL/Plasma-Verhältnis der Proteinkonzentration beider Kompartimente 12 Stunden nach CLP (bzw. 36h nach Hämorrhagie) [120] und 24 Stunden nach CLP (48h nach Hämorrhagie) [85,86]. Auch unter anderen Studienbedingungen unter alleiniger intrapulmonaler Instillation eines Fas-aktivierenden Antikörpers (Jo-2) bzw. eines löslichen rekombinanten humanen Fas-Liganden (rh-sFas) ließen sich erhöhte Proteinkonzentrationen in der BAL von Mäusen nach Trauma nachweisen [53,102]. Interessanterweise zeigte sich bereits 24 Stunden nach Jo-2 Instillation im Gegensatz zu vorliegender Arbeit (12h nach CLP und 36h nach TxT) keine erhöhte Proteinkonzentration mehr. Ein Grund hierfür könnte darin liegen, dass die Double-Hit Prozedur bestehend aus TxT und CLP einen viel stärkeren und lang anhaltenden Einfluss auf die alveoläre Dysfunktion im Gegensatz zur alleinigen Fas-Aktivierung mittels Antikörper ausübt.

In Fas-lpr Tieren konnte eine signifikant verminderte Proteinkonzentration in der BAL gegenüber Wildtyp-Tieren nach Trauma nachgewiesen werden, was auf einen protektiven Effekt bei der Ausbildung einer Schrankenstörung der Lunge hindeutet. Dies wurde ebenfalls in einer Studie am gleichen Fas-Rezeptor-mutierten Mausstamm von Perl et al. im Rahmen eines indirekten ARDS Modells gezeigt. Fas-lpr Mäuse zeigten eine auf Kontrolltierniveau erniedrigtes BAL/Plasma-Verhältnis der Proteinkonzentration 12 Stunden nach CLP und insgesamt 36 Stunden nach hämorrhagischem Schock [120]. Matute-Bello et al. zeigte, dass 6 Stunden nach intratrachealer Jo-2 Instillation die Proteinkonzentration in BAL von Fas-lpr Mäusen auf signifikant vermindertem Niveau gegenüber Wildtyptieren liegt [102]. In Fas-lpr Mäusen wurde ebenfalls 18 Stunden nach Instillation von rekombinantem Fas-Liganden (rh-sFas) eine verminderte Konzentration an Protein und IgM in der BAL gegenüber Wildtyptieren gemessen bzw. Herrero et al. bei Verwendung von Jo-2 bzw. rh-sFas in einem direkten Modell gezeigt [53]. Dies deutet daraufhin, dass in vorliegender Studie von einer verminderten alveolokapillären Dysfunktion bereits vor dem 12 Stunden Zeitpunkt nach CLP in Fas-lpr Tieren auszugehen ist, jedoch aufgrund der fehlenden Messzeitpunkte nicht bewiesen werden kann. Darüber hinaus wurde eine Permeabilitätsstörung von Lungenepithelzellen der Maus bei direkter Fas-Stimulation durch in-vitro Versuche nachgewiesen. Hierbei wurde der Fas-abhängige apoptotische Zelluntergang als Ursache für die Beeinträchtigung der alveolären Clearance identifiziert [53]. Analog lassen sich diese Beobachtungen mit der oben genannten Epithelzellhypothese vereinbaren, die besagt, dass die Apoptose der Epithelzellen der Lunge als Hauptursache der alveolokapillären Dysfunktionalität fungiert. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch fehlende Fas-Signaltransduktion eine verminderte Apoptoserate im Lungengewebe nach Trauma und Sepsis zu beobachten ist. Selbiges gilt für die Auslegung der Neutrophilzell-Hypothese, die besagt, dass die Dysfunktion der alveolo-kapillären Barriere eine Folge der Neutrophilen-Infiltration und der daraus folgenden Schädigung der Epithelzellen ist. Oben dargestellte Ergebnisse konnten eine verminderte Einwanderung von PMN ins Lungengewebe nach DH in Fas-Rezeptor-mutierten Tieren zeigen. Somit scheinen sowohl die Neutrophilen-Infiltration als auch die Epithelzellapoptose eine Fas-Aktivierung als Ursache für die Störung der Lungenintegrität zu stützen und stellen den Fas-Rezeptor als Bindeglied beider Hypothesen in den Mittelpunkt für ein zukünftiges therapeutisches Ziel.

4.5 Histologie

Durch die histologische Auswertung von Dünnschnittpräparaten konnte das Ausmaß der Lungenschädigung nach TxT und Sepsis genau bestimmt werden. So ließen sich typische Anzeichen eines ARDS (Verdickung der Alveolarsepten, Zerreißen in der alveolären Wandstruktur, intra-alveoläre Fibrinablagerungen und Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten) in Wildtyp-Mäusen nach DH, gegenüber Kontrolltieren mit einer intakten Lungenhistologie aufzeigen. Im Vergleich mit bisherigen Studien, sei es bei Anwendung eines direkten (TxT + CLP) oder indirekten (Schock + CLP) Double-Hit Modells konnten diese Veränderungen ebenfalls beobachtet werden. [91,105,118,121]. Desweiteren decken sich diese histologischen Befunde mit dem histologischen Bild im humanen ARDS [6]. So konnte in Studien, in denen Dünnschnittpräparate nach singulärem stumpfen TxT untersucht wurden, neben intraalveolären Einblutungen eine Neutrophilen-Infiltration in die Lunge festgestellt werden [61,62,128]. Eine singuläre CLP Prozedur hingegen führte zu keinen nennenswerten histologischen Veränderungen der Lunge gegenüber Kontrolltieren. Stattdessen waren nur bei der Kombination von Thoraxtrauma und Sepsis alle typischen histologischen Kennzeichen eines ARDS zu beobachten [121]. Interessanterweise hat sich gezeigt, dass bereits die alleinige intrapulmonale Stimulation des Fas-Rezeptors mittels Instillation eines Fas-aktivierenden Antikörpers zu einem ARDS typischen histopathologischen Bild führte [102], was darauf hindeutet dass der Fas-Signalweg einen entscheidenden Faktor bei der Pathophysiologie des ARDS einnimmt. Dies kann in vorliegender Studie bestätigt werden, da Fas-mutierte Tiere nach Thoraxtrauma und Sepsis eine nahezu gleiche Lungenarchitektur wie Kontrolltiere aufwiesen. Somit verifizieren die histologischen Befunde und decken sich mit der Beobachtung einer verminderten Neutrophilen-Infiltration und einer reduzierten alveolo-kapillären Störung nach Double Hit durch die fehlende Fas-Signaltransduktion. Im Double-Hit Modell bestehend aus hämorrhagischem Schock und CLP zeigte sich eine Abmilderung in der geschädigten Lungenarchitektur und PMN-Infiltration durch präinterventionelle Instillation von Fas-siRNA [118]. Messer et al. bestätigen diese Befunde und zeigten eine geringere Ausprägung der ARDS typischen histologischen Alterationen durch Herabregulation der Fas Expression mittels siRNA nach TxT und Sepsis. Dies wurde auch bei der Verwendung von FADD- und Caspase-3-siRNA beobachtet. Da beide Proteine in der Fas-Signalkaskade angesteuert werden ist es nicht verwunderlich, dass durch alleinige Inhibition bzw Mutation des Fas-Rezeptors es zu einer Abschwächung der ARDS-typischen Lungenhistologie kommt [105].

Es lässt sich daraus schließen, dass die Aktivierung des Fas-Signalwegs eine signifikante Rolle bei der Entwicklung eines intraalveolären Ödems spielt und im Gegenzug dies in Fas-mutierten Tieren durch Herabregulation der Apoptoserate und Reduktion der PMN-Infiltration zur Abmilderung des Lungenschadens beiträgt. Dabei ist jedoch histologisch nicht zu klären welcher der beiden Faktoren entscheidend für die Schädigung der Lunge ist. Denn sowohl durch die alleinige Depletion Neutrophiler Granulozyten [121] als auch durch die Reduktion der Apoptoserate mittels Caspase-3 siRNA [105] kam es zu verminderten histopathologischen Veränderungen nach Trauma und Sepsis. Ausgehend davon, dass sowohl die Apoptose als auch die PMN-Infiltration Fas-vermittelt ablaufen ist es demnach wenig überraschend, dass eine Fas-Rezeptor-Mutation zu einem frühen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Vergleichstieren im murinen direkten ARDS-Modell (TxT + CLP) führte und demnach für frühe therapeutische Interventionen optimal genutzt werden könnte [149]. Hingegen dazu kam es in einem Fas-defizienten Mausstamm nach der aerogenen Applikation von *Escherichia Coli* zu geringeren histopathologischen Veränderungen der Lunge [96]. Auch entfalteten Fas-Rezeptor-mutierte Mäuse eine geringere pulmonale Apoptose und zeigten einen Überlebensvorteil als Antwort auf einen *Legionella Pneumophila*-induzierten und Hyperoxie-induzierten Lungenschaden [139]. Darüber hinaus konnte in einem indirekten ARDS Modell bestehend aus hämorrhagischen Schock und polymikrobieller Sepsis ein Benefit für Fas-lpr Mäuse in einer Überlebensstudie über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet werden [120]. Möglicherweise trägt die schwerwiegendere Form der direkten Lungenschädigung durch ein Thoraxtrauma gegenüber der indirekten Form dazu bei, dass eine Fas-Defizienz zu keinem langfristigen Vorteil in Überlebensstudien mit Thoraxtrauma und Sepsis führt. Dieser Unterschied bestärkt zusätzlich die Möglichkeit, dass direktes und indirektes ARDS durch verschiedene Pathomechanismen gesteuert werden.

4.6 Schlussfolgerung

Zusammen genommen konnte der Einfluss des Fas-Signalweges bei der Entwicklung eines ARDS durch stumpfes Thoraxtrauma und Sepsis demonstriert werden, indem er bei der Regulation zweier bedeutender Pathomechanismen beteiligt ist: Pulmonale Inflammation und Lungenapoptose. Selbst in Formen des ARDS, welche durch einen erheblichen Gewebeschaden der Lunge wie z.B. durch Thoraxtrauma vorausgingen, könnte die Inhibition Fas-abhängiger Prozesse von therapeutischen Nutzen sein. Eine Möglichkeit wäre

das Heranziehen von RNA-Interferenz im speziellen die Verwendung von siRNA. Hier zeigten sich bereits aussichtsreiche Ergebnisse in verschiedenen Tiermodellen im Rahmen eines ARDS. Ob diese Therapiestrategien den Krankheitsverlauf im humanen ARDS positiv beeinflussen können müssen weitere Studien in Zukunft zeigen.

5 Zusammenfassung

Das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) ist eine Form der akuten Lungenschädigung, die trotz der zahlreichen Fortschritte in der medizinischen Versorgung immer noch mit einer hohen Mortalität assoziiert ist. Dabei werden Inflammation und Apoptose als zwei mögliche Pathomechanismen bei der Genese dieser klinischen Entität angesehen. Studien haben gezeigt, dass durch die Stimulation des Fas/Fas-Ligand Systems sowohl inflammatorische, als auch apoptotische intrazelluläre Signalprozesse induziert werden. Es ist jedoch weiterhin unklar, welche pathogenetische Rolle das Fas-System bei der Entstehung eines ARDS unter klinisch relevanten Konditionen einnimmt. Ziel dieser Arbeit war daher die Fas-abhängige Regulation von Apoptose und Inflammation in einem klinisch relevanten ARDS Modell der Maus zu untersuchen.

Dabei wurden zwei Mausstämme, C57BL/6, ein Wildtypstamm und B6.MRL-Fas^{lpr}/J (lpr), ein Mausstamm der sich durch eine fehlerhafte Expression des Fas-Rezeptors auszeichnet einem stumpfen Thoraxtrauma unterzogen. Anschließend erfolgte 24 Stunden später die Induktion einer polymikrobiellen Sepsis durch zökale Ligatur und Punktion (CLP). Die inflammatorische und apoptotische Antwort beider Mausstämme wurde weitere 24 bzw. 12 Stunden später analysiert. Herangezogen dazu wurde die Bestimmung zahlreicher Zytokine und Chemokine im Plasma, der Lunge, Bronchoalveolären Lavage (BAL), sowie des Proteingehaltes der BAL und der Myeloperoxidaseaktivität der Lunge (MPO). Die Lungenhistologie von Dünnschnittpräparaten wurde ebenfalls bewertet, sowie apoptotische Vorgänge in der Lunge mittels Bestimmung der aktiven Caspase 3 via Western-Blotting Technik und TUNEL (TdTmediated dUTP-biotin nick end labeling)-Färbung von Lungengewebschnitten. Die Kombination von Thoraxtrauma und Sepsis führte zu erhöhten Zytokin und Chemokin-Konzentrationen in Plasma, BAL und Lungengewebe der Wildtyp-Mäuse. In Tieren mit Fas-Rezeptor-Mutation wurden im Gegenzug signifikant erniedrigte Werte gemessen. Dabei korrelierten die Beobachtungen der Inflammation auf Zytokinebene mit der Infiltration Neutrophiler Granulozyten ins Lungengewebe. Diese Infiltration wurde ebenfalls durch Fas-Rezeptor-Mutation attenuiert. Zusätzlich kam es zu verminderter Apoptoserate in der Lunge in Abwesenheit der Fas-Signaltransduktion gegenüber dem Wildtypstamm. Eine Schrankenstörung der alveolo-kapillären Barriere ließ sich nur im Wildtypstamm feststellen. Diese blieb in Fas-Rezeptor-mutierten Tieren ebenfalls aus. Da Inflammation, Neutrophilen-Infiltration und Apoptose als richtungsweisende Mechanismen bei der Pathophysiologie des ARDS gesehen werden, konnte in vorliegender Studie gezeigt

werden, dass der Fas-Signalweg durch die Herabregulation dieser Prozesse kritisch bei der Entstehung des ARDS involviert ist und als wichtiger Ansatzpunkt bei der Erforschung der Pathogenese darstellt. Gleichzeitig wurde auch verdeutlicht, dass die Fas-Signalkaskade nur eine von vielen ineinandergreifenden intrazellulär ablaufenden Prozessen ist und der Fas-Rezeptor nicht als einziger Todesrezeptor bei der Pathogenese des ARDS beteiligt ist. Dennoch könnte die Inhibition des Fas-Signalweges zusammen mit anderen Todesrezeptor-Signalwegen als Zielstruktur für zukünftige therapeutische Strategien dienen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Abadie Y, Bregeon F, Papazian L, Lange F, Chailley-Heu B, Thomas P, Duvaldestin P, Adnot S, Maitre B, Delclaux C: Decreased VEGF concentration in lung tissue and vascular injury during ARDS. *Eur Respir J* 25: 139-146 (2005)
- [2] Aggarwal A, Baker CS, Evans TW, Haslam PL: G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 15: 895-901 (2000)
- [3] Ahn JH, Park SM, Cho HS, Lee MS, Yoon JB, Vilcek J, Lee TH: Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J Biol Chem* 276: 47100-47106 (2001)
- [4] Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman GA, Matthay MA, Ware LB: Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Pathol* 161: 1783-1796 (2002)
- [5] Anderson WR, Thielen K: Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy. *Ultrastruct Pathol* 16: 615-628 (1992)
- [6] Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2: 319-323 (1967)
- [7] Ayala A, Chung CS, Lomas JL, Song GY, Doughty LA, Gregory SH, Cioffi WG, LeBlanc BW, Reichner J, Simms HH, Grutkoski PS: Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice: divergent effects of TLR-4 and TLR-4/FasL deficiency. *Am J Pathol* 161: 2283-2294 (2002)
- [8] Bachofen M, Weibel ER: Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 116: 589-615 (1977)
- [9] Bachofen M, Weibel ER: Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 3: 35-56 (1982)
- [10] Bannerman DD, Goldblum SE: Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab Invest* 79: 1181-1199 (1999)
- [11] Bannerman DD, Goldblum SE: Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L899-L914 (2003)
- [12] Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM: Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *Am J Pathol* 149: 845-852 (1996)
- [13] Bem RA, Farnand AW, Wong V, Koski A, Rosenfeld ME, van RN, Frevert CW, Martin TR, Matute-Bello G: Depletion of resident alveolar macrophages does not

- prevent Fas-mediated lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L314-L325 (2008)
- [14] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R: Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee. *Intensive Care Med* 20: 225-232 (1994)
- [15] Bosmann M, Russkamp NF, Ward PA: Fingerprinting of the TLR4-induced acute inflammatory response. *Exp Mol Pathol* 93: 319-323 (2012)
- [16] Bozic CR, Kolakowski LF, Jr., Gerard NP, Garcia-Rodriguez C, von Uexkull-Guldenband C, Conklyn MJ, Breslow R, Showell HJ, Gerard C: Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. *J Immunol* 154: 6048-6057 (1995)
- [17] Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT: Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 11: R49 (2007)
- [18] Brandstetter S, Dodoo-Schittko F, Blecha S, Sebok P, Thomann-Hackner K, Quintel M, Weber-Carstens S, Bein T, Apfelbacher C: Influence of quality of care and individual patient characteristics on quality of life and return to work in survivors of the acute respiratory distress syndrome: protocol for a prospective, observational, multi-centre patient cohort study (DACAPO). *BMC Health Serv Res* 15: 563 (2015)
- [19] Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Romand JA, Villar J, Thorsteinsson A, Damas P, Armaganidis A, Lemaire F: Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med* 30: 51-61 (2004)
- [20] Bruns B, Honle T, Kellermann P, Ayala A, Perl M: Divergent Effects of Neutrophils on Fas-Induced Pulmonary Inflammation, Apoptosis, and Lung Damage. *Shock* 2016)
- [21] Buccellato LJ, Tso M, Akinici OI, Chandel NS, Budinger GR: Reactive oxygen species are required for hyperoxia-induced Bax activation and cell death in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 279: 6753-6760 (2004)
- [22] Budd RC: Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* 109: 437-441 (2002)
- [23] Bull TM, Clark B, McFann K, Moss M: Pulmonary vascular dysfunction is associated with poor outcomes in patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 1123-1128 (2010)
- [24] Carney DE, Lutz CJ, Picone AL, Gatto LA, Ramamurthy NS, Golub LM, Simon SR, Searles B, Paskanik A, Snyder K, Finck C, Schiller HJ, Nieman GF: Matrix metalloproteinase inhibitor prevents acute lung injury after cardiopulmonary bypass. *Circulation* 100: 400-406 (1999)

-
- [25] Chen L, Arora M, Yarlagadda M, Oriss TB, Krishnamoorthy N, Ray A, Ray P: Distinct responses of lung and spleen dendritic cells to the TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotide. *J Immunol* 177: 2373-2383 (2006)
- [26] Cheung AM, Tansey CM, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Matte A, Barr A, Mehta S, Mazer CD, Guest CB, Stewart TE, Al-Saidi F, Cooper AB, Cook D, Slutsky AS, Herridge MS: Two-year outcomes, health care use, and costs of survivors of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 538-544 (2006)
- [27] Chinnaiyan AM: The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1: 5-15 (1999)
- [28] Chuang CY, Chen TL, Cherng YG, Tai YT, Chen TG, Chen RM: Lipopolysaccharide induces apoptotic insults to human alveolar epithelial A549 cells through reactive oxygen species-mediated activation of an intrinsic mitochondrion-dependent pathway. *Arch Toxicol* 85: 209-218 (2011)
- [29] de Jong HK, van der Poll T, Wiersinga WJ: The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J Innate Immun* 2: 422-430 (2010)
- [30] Dosreis GA, Borges VM, Zin WA: The central role of Fas-ligand cell signaling in inflammatory lung diseases. *J Cell Mol Med* 8: 285-293 (2004)
- [31] Edelman DA, Jiang Y, Tyburski J, Wilson RF, Steffes C: Pericytes and their role in microvasculature homeostasis. *J Surg Res* 135: 305-311 (2006)
- [32] Endo S, Sato N, Yaegashi Y, Suzuki Y, Kojika M, Yamada Y, Yoshida Y, Nakadate T, Aoki H, Inoue Y: Sivelestat sodium hydrate improves septic acute lung injury by reducing alveolar dysfunction. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 119: 53-65 (2006)
- [33] Ertel W, Keel M, Buergi U, Hartung T, Imhof HG, 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)
- [34] Ertel W, Keel M, Infanger M, Ungethum U, Steckholzer U, Trentz O: Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation. *J Trauma* 44: 767-775 (1998)
- [35] Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM: The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5: 551-562 (1998)
- [36] Fadok VA, de CA, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL: Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 276: 1071-1077 (2001)
- [37] Fanelli V, Vlachou A, Ghannadian S, Simonetti U, Slutsky AS, Zhang H: Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options. *J Thorac Dis* 5: 326-334 (2013)

-
- [38] Farley SM, Dotson AD, Purdy DE, Sundholm AJ, Schneider P, Magun BE, Iordanov MS: Fas ligand elicits a caspase-independent proinflammatory response in human keratinocytes: implications for dermatitis. *J Invest Dermatol* 126: 2438-2451 (2006)
- [39] Farnand AW, Eastman AJ, Herrero R, Hanson JF, Mongovin S, Altemeier WA, 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)
- [40] 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)
- [41] Fox-Dewhurst R, Alberts MK, Kajikawa O, Caldwell E, Johnson MC, Skerrett SJ, Goodman RB, Ruzinski JT, Wong VA, Chi EY, Martin TR: Pulmonary and systemic inflammatory responses in rabbits with gram-negative pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 2030-2040 (1997)
- [42] Fujita M, Kuwano K, Kunitake R, Hagimoto N, Miyazaki H, Kaneko Y, Kawasaki M, Maeyama T, Hara N: Endothelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 117: 202-208 (1998)
- [43] Golks A, Brenner D, Krammer PH, Lavrik IN: The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. *J Exp Med* 203: 1295-1305 (2006)
- [44] Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL, Walz A, Hudson LD, Martin TR: Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 602-611 (1996)
- [45] Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull W, Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD, Martin TR: Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1843-1850 (1999)
- [46] Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA, III, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM: Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 88: 1976-1981 (1991)
- [47] Grimm S, Stanger BZ, Leder P: RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10923-10927 (1996)
- [48] Grommes J, Soehnlein O: Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med* 17: 293-307 (2011)
- [49] Guo Z, Zhang M, Tang H, Cao X: Fas signal links innate and adaptive immunity by promoting dendritic-cell secretion of CC and CXC chemokines. *Blood* 106: 2033-2041 (2005)

-
- [50] 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)
- [51] Hahn I, Klaus A, Janze AK, Steinwede K, Ding N, Bohling J, Brumshagen C, Serrano H, Gauthier F, Paton JC, Welte T, Maus UA: Cathepsin G and neutrophil elastase play critical and nonredundant roles in lung-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun* 79: 4893-4901 (2011)
- [52] He CH, Waxman AB, Lee CG, Link H, Rabach ME, Ma B, Chen Q, Zhu Z, Zhong M, Nakayama K, Nakayama KI, Homer R, Elias JA: Bcl-2-related protein A1 is an endogenous and cytokine-stimulated mediator of cytoprotection in hyperoxic acute lung injury. *J Clin Invest* 115: 1039-1048 (2005)
- [53] Herrero R, Tanino M, Smith LS, Kajikawa O, Wong VA, Mongovin S, Matute-Bello G, Martin TR: The Fas/FasL pathway impairs the alveolar fluid clearance in mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305: L377-L388 (2013)
- [54] Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, Matte-Martyn A, Diaz-Granados N, Al-Saidi F, Cooper AB, Guest CB, Mazer CD, Mehta S, Stewart TE, Barr A, Cook D, Slutsky AS: One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 348: 683-693 (2003)
- [55] Herridge MS, Tansey CM, Matte A, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Cooper A, Guest CB, Mazer CD, Mehta S, Stewart TE, Kudlow P, Cook D, Slutsky AS, Cheung AM: Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 364: 1293-1304 (2011)
- [56] Hierholzer C, Kelly E, Lyons V, Roedling E, Davies P, Billiar TR, Tweardy DJ: G-CSF instillation into rat lungs mediates neutrophil recruitment, pulmonary edema, and hypoxia. *J Leukoc Biol* 63: 169-174 (1998)
- [57] Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ: Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* 23: 2134-2145 (2004)
- [58] Hogg JC, Doerschuk CM: Leukocyte traffic in the lung. *Annu Rev Physiol* 57: 97-114 (1995)
- [59] Hohlbaum AM, Gregory MS, Ju ST, Marshak-Rothstein A: Fas ligand engagement of resident peritoneal macrophages in vivo induces apoptosis and the production of neutrophil chemotactic factors. *J Immunol* 167: 6217-6224 (2001)
- [60] Hopkins RO, Herridge MS: Quality of life, emotional abnormalities, and cognitive dysfunction in survivors of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 27: 679-689 (2006)
- [61] Hoth JJ, Hudson WP, Brownlee NA, Yoza BK, Hiltbold EM, Meredith JW, McCall CE: Toll-like receptor 2 participates in the response to lung injury in a murine model of pulmonary contusion. *Shock* 28: 447-452 (2007)

- [62] Hoth JJ, Martin RS, Yoza BK, Wells JD, Meredith JW, McCall CE: Pulmonary contusion primes systemic innate immunity responses. *J Trauma* 67: 14-21 (2009)
- [63] Hoth JJ, Wells JD, Hiltbold EM, McCall CE, Yoza BK: Mechanism of neutrophil recruitment to the lung after pulmonary contusion. *Shock* 35: 604-609 (2011)
- [64] Hsu H, Xiong J, Goeddel DV: The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81: 495-504 (1995)
- [65] Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ: Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 293-301 (1995)
- [66] Jackson JC, Girard TD, Gordon SM, Thompson JL, Shintani AK, Thomason JW, Pun BT, Canonico AE, Dunn JG, Bernard GR, Dittus RS, Ely EW: Long-term cognitive and psychological outcomes in the awakening and breathing controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 183-191 (2010)
- [67] Johnston CJ, Rubenfeld GD, Hudson LD: Effect of age on the development of ARDS in trauma patients. *Chest* 124: 653-659 (2003)
- [68] Kearns MT, Barthel L, Bednarek JM, Yunt ZX, Henson PM, Janssen WJ: Fas ligand-expressing lymphocytes enhance alveolar macrophage apoptosis in the resolution of acute pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 307: L62-L70 (2014)
- [69] Keel M, Ecknauer E, Stocker R, Ungethum U, Steckholzer U, Kenney J, Gallati H, Trentz O, Ertel W: Different pattern of local and systemic release of proinflammatory and anti-inflammatory mediators in severely injured patients with chest trauma. *J Trauma* 40: 907-912 (1996)
- [70] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257 (1972)
- [71] Kiehl MG, Ostermann H, Thomas M, Muller C, Cassens U, Kienast J: Inflammatory mediators in bronchoalveolar lavage fluid and plasma in leukocytopenic patients with septic shock-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 26: 1194-1199 (1998)
- [72] Kim YK, Lee EK, Kang JK, Kim JA, You JS, Park JH, Seo DW, Hwang JW, Kim SN, Lee HY, Lee HW, Han JW: Activation of NF-kappaB by HDAC inhibitor apicidin through Sp1-dependent de novo protein synthesis: its implication for resistance to apoptosis. *Cell Death Differ* 13: 2033-2041 (2006)
- [73] Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14: 5579-5588 (1995)
- [74] Kitamura Y, Hashimoto S, Mizuta N, Kobayashi A, Kooguchi K, Fujiwara I, Nakajima H: Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after

- lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 762-769 (2001)
- [75] Kredel M, Bierbaum D, Lotz C, Kustermann J, Roewer N, Muellenbach RM: [Therapy of acute respiratory distress syndrome : Survey of German ARDS centers and scientific evidence]. *Anaesthesist* 64: 277-285 (2015)
- [76] Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, Samel D, Leverkus M, Janssen O, Hacker G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Scheurich P, Wajant H: NF κ B activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol* 166: 369-380 (2004)
- [77] Krick S, Eul BG, Hanze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, Rose F: Role of hypoxia-inducible factor-1 α in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 395-403 (2005)
- [78] Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain SN: Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1883-1889 (1998)
- [79] Kubo H, Morgenstern D, Quinlan WM, Ward PA, Dinarello CA, Doerschuk CM: Preservation of complement-induced lung injury in mice with deficiency of NADPH oxidase. *J Clin Invest* 97: 2680-2684 (1996)
- [80] Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, Ohara M, Gropper MA, Frank DW, Martin TR, Wiener-Kronish JP: Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 104: 743-750 (1999)
- [81] Lafeuvre MD, Simon RH, Flint A, Keller JB: Adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *Am J Med* 80: 1022-1026 (1986)
- [82] Lee KS, Choi YH, Kim YS, Baik SH, Oh YJ, Sheen SS, Park JH, Hwang SC, Park KJ: Evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from ARDS patients with regard to apoptosis. *Respir Med* 102: 464-469 (2008)
- [83] Lewis JF, Jobe AH: Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 147: 218-233 (1993)
- [84] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501 (2001)
- [85] Lomas-Neira J, Chung CS, Perl M, Gregory S, Biffl W, Ayala A: Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L51-L58 (2006)
- [86] Lomas-Neira JL, Chung CS, Grutkoski PS, Miller EJ, Ayala A: CXCR2 inhibition suppresses hemorrhage-induced priming for acute lung injury in mice. *J Leukoc Biol* 76: 58-64 (2004)
- [87] Lomas-Neira JL, Chung CS, Wesche DE, Perl M, Ayala A: 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. *J Leukoc Biol* 77: 846-853 (2005)
- [88] Ma X, Xu D, Ai Y, Ming G, Zhao S: Fas inhibition attenuates lipopolysaccharide-induced apoptosis and cytokine release of rat type II alveolar epithelial cells. *Mol Biol Rep* 37: 3051-3056 (2010)
- [89] MacNee W, Selby C: Neutrophil kinetics in the lungs. *Clin Sci (Lond)* 79: 97-107 (1990)
- [90] Martin C, Papazian L, Payan MJ, Saux P, Gouin F: Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients. *Chest* 107: 196-200 (1995)
- [91] Matsuda N, Yamamoto S, Takano K, Kageyama S, 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)
- [92] Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C: Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* 82: 569-600 (2002)
- [93] Matthay MA, Wiener-Kronish JP: Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis* 142: 1250-1257 (1990)
- [94] Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, Bhattacharya J, Collier B, Doerschuk CM, Floros J, Gimbrone MA, Jr., Hoffman E, Hubmayr RD, Leppert M, Matalon S, Munford R, Parsons P, Slutsky AS, Tracey KJ, Ward P, Gail DB, Harabin AL: Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 1027-1035 (2003)
- [95] Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM: An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44: 725-738 (2011)
- [96] Matute-Bello G, Frevert CW, Liles WC, Nakamura M, Ruzinski JT, Ballman K, Wong VA, Vathanaprida C, Martin TR: Fas/Fas ligand system mediates epithelial injury, but not pulmonary host defenses, in response to inhaled bacteria. *Infect Immun* 69: 5768-5776 (2001)
- [97] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR: Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L379-L399 (2008)
- [98] Matute-Bello G, Lee JS, Liles WC, Frevert CW, Mongovin S, Wong V, Ballman K, Sutlief S, Martin TR: Fas-mediated acute lung injury requires fas expression on nonmyeloid cells of the lung. *J Immunol* 175: 4069-4075 (2005)
- [99] Matute-Bello G, Liles WC, Frevert CW, Nakamura M, Ballman K, Vathanaprida C, Kiener PA, Martin TR: Recombinant human Fas ligand induces alveolar

- epithelial cell apoptosis and lung injury in rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L328-L335 (2001)
- [100] Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, Martin TR: Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 28: 1-7 (2000)
- [101] Matute-Bello G, Liles WC, Steinberg KP, Kiener PA, Mongovin S, Chi EY, Jonas M, Martin TR: Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *J Immunol* 163: 2217-2225 (1999)
- [102] Matute-Bello G, Winn RK, Jonas M, Chi EY, Martin TR, Liles WC: Fas (CD95) induces alveolar epithelial cell apoptosis in vivo: implications for acute pulmonary inflammation. *Am J Pathol* 158: 153-161 (2001)
- [103] Matute-Bello G, Winn RK, Martin TR, Liles WC: Sustained lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mice is attenuated by functional deficiency of the Fas/Fas ligand system. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 358-361 (2004)
- [104] Meduri GU: Late adult respiratory distress syndrome. *New Horiz* 1: 563-577 (1993)
- [105] Messer MP, Kellermann P, Weber SJ, Hohmann C, Denk S, Klohs B, Schultze A, Braumuller S, Huber-Lang MS, 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)
- [106] Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C, Grutter MG: The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277: 45162-45171 (2002)
- [107] Miwa K, Asano M, Horai R, Iwakura Y, Nagata S, Suda T: Caspase 1-independent IL-1 β release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med* 4: 1287-1292 (1998)
- [108] Monchi M, Bellenfant F, Cariou A, Joly LM, Thebert D, Laurent I, Dhainaut JF, Brunet F: Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1076-1081 (1998)
- [109] Murakami K, McGuire R, Cox RA, Jodoin JM, Bjertnaes LJ, Katahira J, Traber LD, Schmalstieg FC, Hawkins HK, Herndon DN, Traber DL: Heparin nebulization attenuates acute lung injury in sepsis following smoke inhalation in sheep. *Shock* 18: 236-241 (2002)
- [110] Neff TA, Guo RF, Neff SB, Sarma JV, Speyer CL, Gao H, Bernacki KD, Huber-Lang M, McGuire S, Hoesel LM, Riedemann NC, Beck-Schimmer B, Zetoune FS, Ward PA: Relationship of acute lung inflammatory injury to Fas/FasL system. *Am J Pathol* 166: 685-694 (2005)

-
- [111] Ni R, Tomita Y, Matsuda K, Ichihara A, Ishimura K, Ogasawara J, Nagata S: Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *Exp Cell Res* 215: 332-337 (1994)
- [112] Ognibene FP, Martin SE, Parker MM, Schlesinger T, Roach P, Burch C, Shelhamer JH, Parrillo JE: Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia. *N Engl J Med* 315: 547-551 (1986)
- [113] Papazian L, Doddoli C, Chetaille B, Gernez Y, Thirion X, Roch A, Donati Y, Bonnetty M, Zandotti C, Thomas P: A contributive result of open-lung biopsy improves survival in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med* 35: 755-762 (2007)
- [114] Park DR, Thomsen AR, Frevert CW, Pham U, Skerrett SJ, Kiener PA, Liles WC: Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 170: 6209-6216 (2003)
- [115] Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H: The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol* 25: 561-586 (2007)
- [116] Parsons PE, Fowler AA, Hyers TM, Henson PM: Chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 132: 490-493 (1985)
- [117] Patel BV, Wilson MR, O'Dea KP, Takata M: TNF-induced death signaling triggers alveolar epithelial dysfunction in acute lung injury. *J Immunol* 190: 4274-4282 (2013)
- [118] Perl M, Chung CS, Lomas-Neira J, Rachel TM, Biffl WL, Cioffi WG, 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)
- [119] Perl M, Chung CS, Perl U, Biffl WL, Cioffi WG, Ayala A: Beneficial versus detrimental effects of neutrophils are determined by the nature of the insult. *J Am Coll Surg* 204: 840-852 (2007)
- [120] Perl M, Chung CS, Perl U, Lomas-Neira J, de PM, Cioffi WG, Ayala A: Fas-induced pulmonary apoptosis and inflammation during indirect acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 591-601 (2007)
- [121] Perl M, Hohmann C, Denk S, Kellermann P, Lu D, Braumuller S, Bachem MG, Thomas J, Knoferl MW, Ayala A, Gebhard F, Huber-Lang MS: Role of activated neutrophils in chest trauma-induced septic acute lung injury. *Shock* 38: 98-106 (2012)
- [122] Perl M, Lomas-Neira J, Venet F, Chung CS, Ayala A: Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. *Expert Rev Respir Med* 5: 115-126 (2011)
- [123] Peters AM, Saverymuttu SH, Keshavarzian A, Bell RN, Lavender JP: Splenic pooling of granulocytes. *Clin Sci (Lond)* 68: 283-289 (1985)

-
- [124] Phua J, Stewart TE, Ferguson ND: Acute respiratory distress syndrome 40 years later: time to revisit its definition. *Crit Care Med* 36: 2912-2921 (2008)
- [125] Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA: Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1187-1205 (1997)
- [126] Proudfoot AG, McAuley DF, Griffiths MJ, Hind M: Human models of acute lung injury. *Dis Model Mech* 4: 145-153 (2011)
- [127] Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA: The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 27: 304-312 (1999)
- [128] Raghavendran K, Davidson BA, Woytash JA, Helinski JD, Marschke CJ, Manderscheid PA, Notter RH, Knight PR: The evolution of isolated bilateral lung contusion from blunt chest trauma in rats: cellular and cytokine responses. *Shock* 24: 132-138 (2005)
- [129] Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS: Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 307: 2526-2533 (2012)
- [130] Robertson CM, Perrone EE, McConnell KW, Dunne WM, Boody B, Brahmabhatt T, Diacovo MJ, van RN, Hogue LA, Cannon CL, Buchman TG, Hotchkiss RS, Coopersmith CM: Neutrophil depletion causes a fatal defect in murine pulmonary *Staphylococcus aureus* clearance. *J Surg Res* 150: 278-285 (2008)
- [131] Rocco PR, Dos SC, Pelosi P: Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome. *Minerva Anesthesiol* 75: 730-740 (2009)
- [132] Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD: Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 353: 1685-1693 (2005)
- [133] Sakahira H, Enari M, Nagata S: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99 (1998)
- [134] Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME: The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274: 1541-1548 (1999)
- [135] Shasby DM, Vanbenthuyzen KM, Tate RM, Shasby SS, McMurtry I, Repine JE: Granulocytes mediate acute edematous lung injury in rabbits and in isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate: role of oxygen radicals. *Am Rev Respir Dis* 125: 443-447 (1982)
- [136] Speyer CL, Gao H, Rancilio NJ, Neff TA, Huffnagle GB, Sarma JV, Ward PA: Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am J Pathol* 165: 2187-2196 (2004)
- [137] Strohmaier W, Trupka A, Pfeiler C, Thurnher M, Khakpour Z, Gippner-Steppert C, Jochum M, Redl H: Bilateral lavage with diluted surfactant improves lung

- function after unilateral lung contusion in pigs. *Crit Care Med* 33: 2286-2293 (2005)
- [138] Suratt BT, Parsons PE: Mechanisms of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 27: 579-589 (2006)
- [139] Tateda K, Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Paine R, III, Kobayashi N, Yamaguchi K, Standiford TJ: Hyperoxia mediates acute lung injury and increased lethality in murine *Legionella pneumoniae*: the role of apoptosis. *J Immunol* 170: 4209-4216 (2003)
- [140] Thome M, Tschopp J: Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 1: 50-58 (2001)
- [141] Toth S, Pingorova S, Jonecova Z, Morochovic R, Pomfy M, Vesela J: Adult Respiratory Distress Syndrome and alveolar epithelium apoptosis: an histopathological and immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol* 47: 431-434 (2009)
- [142] Ueno Y, Ishii M, Yahagi K, Mano Y, Kisara N, Nakamura N, Shimosegawa T, Toyota T, Nagata S: Fas-mediated cholangiopathy in the murine model of graft versus host disease. *Hepatology* 31: 966-974 (2000)
- [143] Ussov WY, Aktolun C, Myers MJ, Jamar F, Peters AM: Granulocyte margination in bone marrow: comparison with margination in the spleen and liver. *Scand J Clin Lab Invest* 55: 87-96 (1995)
- [144] Vansteenkiste JF, Boogaerts MA: Adult respiratory distress syndrome in neutropenic leukemia patients. *Blut* 58: 287-290 (1989)
- [145] Wajant H: The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296: 1635-1636 (2002)
- [146] Ware LB, Koyama T, Billheimer DD, Wu W, Bernard GR, Thompson BT, Brower RG, Standiford TJ, Martin TR, Matthay MA: Prognostic and pathogenetic value of combining clinical and biochemical indices in patients with acute lung injury. *Chest* 137: 288-296 (2010)
- [147] Ware LB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334-1349 (2000)
- [148] Ware LB, Matthay MA: Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1376-1383 (2001)
- [149] Weckbach S, Hohmann C, Denk S, Kellermann P, Huber-Lang MS, 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. *J Trauma Acute Care Surg* 74: 792-800 (2013)

- [150] Wheeler AP, Bernard GR: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet* 369: 1553-1564 (2007)
- [151] Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA: Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *J Clin Invest* 88: 864-875 (1991)
- [152] Wortinger MA, Foley JW, Larocque P, Witcher DR, Lahn M, Jakubowski JA, Glasebrook A, Song HY: Fas ligand-induced murine pulmonary inflammation is reduced by a stable decoy receptor 3 analogue. *Immunology* 110: 225-233 (2003)
- [153] Zemans RL, Briones N, Campbell M, McClendon J, Young SK, Suzuki T, Yang IV, De LS, Reynolds SD, Mason RJ, Kahn M, Henson PM, Colgan SP, Downey GP: Neutrophil transmigration triggers repair of the lung epithelium via beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 15990-15995 (2011)

Danksagung

- Diese Seite wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt. -

Lebenslauf

- Diese Seite wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt. -

- Diese Seite wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt. -