

**Protektive Effekte der nicht-myeloiden
Hämoxxygenase-1 im Rahmen der LPS-induzierten
pulmonalen Inflammation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Knausberg, Urs Daniel

2015

| | |
|----------------------|--------------------------------|
| Dekan: | Professor Dr. I. B. Autenrieth |
| 1. Berichterstatter: | Professor Dr. J. Reutershan |
| 2. Berichterstatter: | Professor Dr. T. Schroeder |

Inhalt

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung..... | 6 |
| 1.1. Akute Respiratorische Insuffizienz | 6 |
| Ätiologie..... | 6 |
| Epidemiologie | 6 |
| Klinik..... | 7 |
| 1.2. Pathophysiologie des ARDS | 7 |
| Einwanderung polymorphonukleärer Leukozyten in die Lunge..... | 8 |
| Zytokine im ARDS | 10 |
| Chemokine im ARDS..... | 11 |
| Mikrovaskuläre Permeabilitätserhöhung im ARDS | 11 |
| Oxidativer Schaden im ARDS..... | 12 |
| 1.3. Hämoxygenase-1 | 12 |
| Enzymologie | 12 |
| Anti-inflammatorische und zytoprotektive Eigenschaften der Hämoxygenase-1..... | 14 |
| Rolle der Hämoxygenase-1 im ARDS..... | 16 |
| 1.4. Fragestellungen der Arbeit..... | 17 |
| 2. Material und Methoden | 18 |
| 2.1. Material | 18 |
| Versuchstiere..... | 18 |
| Geräte..... | 18 |
| Verbrauchsmaterialien | 19 |
| Chemikalien | 21 |
| Medien..... | 21 |

| | |
|---|----|
| Enzyme..... | 22 |
| Medikamente | 22 |
| Antikörper | 23 |
| 2.2. Induktion einer pulmonalen Inflammation im Mausmodell..... | 23 |
| 2.3. Induktion und Inhibition der Hämoxigenase-1 im Mausmodell | 24 |
| 2.4. Differentialblutbild..... | 26 |
| 2.5. Erstellung immunhistochemischer Lungengewebspräparate | 26 |
| Gewinnung histologischer Lungengewebspräparate | 26 |
| Immunhistochemische Färbung von PMNs | 27 |
| Immunfluoreszenzfärbung der Hämoxigenase-1 | 29 |
| 2.6. Quantifizierung der Einwanderung von PMNs in die verschiedenen Kompartimente der Lunge <i>in vivo</i> | 29 |
| Organentnahme..... | 30 |
| Weitere Verarbeitung der BAL und der Lungen | 31 |
| Färbung für die Durchflusszytometrie | 31 |
| Durchflusszytometrische Analyse | 32 |
| 2.7. Evans blue Extravasationsversuch..... | 34 |
| Probengewinnung..... | 35 |
| Analyse | 35 |
| 2.8. Messung der Zytokinkonzentrationen in der BAL..... | 36 |
| Gewinnung der BAL..... | 36 |
| Analyse der BAL mittels Sandwich-ELISA..... | 36 |
| 2.9. Enzymaktivitätsbestimmung der Hämoxigenase-1..... | 37 |
| Probenentnahme | 37 |
| Analyse der Gewebeproben | 39 |
| Proteinbestimmung..... | 39 |

| | |
|--|----|
| 2.10. Statistische Auswertung | 40 |
| 3. Ergebnisse | 41 |
| 3.1. Differentialblutbild von Wildtyp- und HMOX flox/flox-Tieren | 41 |
| 3.2. Charakterisierung der pulmonalen Entzündungsreaktion in der Histologie mittels immunhistochemischer Darstellung von PMNs | 42 |
| 3.3. Darstellung der Hämoxygenase-1-Expression mittels Immunfluoreszenzfärbung..... | 45 |
| 3.4. Quantifizierung der PMN-Migration in die verschiedenen Kompartimente der Lunge..... | 47 |
| 3.5. Mikrovaskuläre Permeabilität | 52 |
| 3.6. Messung der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in der BAL..... | 55 |
| 3.7. Enzymaktivitätsbestimmung der Hämoxygenase-1 | 59 |
| 4. Diskussion | 62 |
| 5. Zusammenfassung | 71 |
| 6. Abkürzungsverzeichnis | 73 |
| 7. Abbildungsverzeichnis | 75 |
| 8. Literaturverzeichnis..... | 77 |
| 9. Erklärungen zum Eigenanteil | 83 |
| 10. Veröffentlichung | 83 |
| 11. Danksagung..... | 84 |

1. Einleitung

1.1. Akute Respiratorische Insuffizienz

Die Akute Respiratorische Insuffizienz (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) ist ein akut einsetzendes Krankheitsbild, das sich durch die Entwicklung eines nicht-kardiogenen Lungenödems und durch eine therapierefraktäre Hypoxämie auszeichnet¹. Das ARDS weist selbst bei intensivmedizinischer Überwachung eine sehr hohe Letalität von ca. 40% auf. Derzeit gibt es keine kausale Therapie, es sind lediglich supportive Therapiemöglichkeiten wie die Beatmung mit niedrigen Volumina verfügbar.

Ätiologie

Einer der Hauptgründe für einen fehlenden kausalen Therapieansatz ist, dass sehr unterschiedliche Ursachen zur Entwicklung eines ARDS führen können. So kann es im Verlauf einer Pneumonie oder bei schwerer Sepsis zum ARDS kommen. Seltener Ursachen für ein ARDS sind Trauma, Aspirationspneumonie, Inhalationstrauma, Pankreatitis, nicht-septischer Schock, Beinahe-Ertrinken und multiple Bluttransfusionen^{1,2}.

Epidemiologie

Zur Inzidenz des ARDS gibt es sehr unterschiedliche Angaben, von 3 bis 88 pro 100 000 Einwohner². In einer multizentrischen Kohortenanalyse wird für die Vereinigten Staaten von Amerika eine Inzidenz von 78,9 pro 100 000 Einwohner für Acute Lung Injury (ALI), das nach der Berlin-Definition der milden Form des ARDS entspricht (s.u.), angegeben³. Für das ARDS, das der moderaten und der schweren Form des ARDS nach der Berlin-Definition entspricht, wird eine Inzidenz von 58,7 pro 100 000 Einwohner angegeben. Die Letalität für hospitalisierte Patienten betrug demnach 38,5% für ALI und 41,1% für ARDS.

Klinik

Klinisch wird der Verlauf des ARDS in drei Stadien unterteilt. Zuerst kommt es zu Hypoxämie und Hyperventilation mit respiratorischer Alkalose, bei zunehmender Atemnot können dann erste Veränderungen im Röntgenbild der Lunge ausgemacht werden, bevor dann eine respiratorische Globalinsuffizienz auftritt, die eine respiratorische Azidose bedingt⁴.

2012 wurde von einer internationalen ARDS Definition Task Force die sogenannte Berlin-Definition des ARDS eingeführt, die eine einheitliche Diagnosestellung des ARDS und eine Einteilung in Schweregrade ermöglichen soll^{5,6}. Das ARDS wurde nach dem Grad der Oxygenierungsstörung in eine milde, eine moderate und eine schwere Form unterteilt. Die Kriterien für die Diagnose ARDS sind:

- Beginn der Symptomatik innerhalb einer Woche
- Bilaterale Infiltrate im Röntgenbild des Thorax (anterior-posteriorer Strahlengang), die sich nicht vollständig durch Pleuraergüsse, Atelektasen oder Rundherde erklären lassen
- Respiratorisches Versagen nicht ausschließlich über Herzversagen oder Volumenüberschuss erklärbar
- Oxygenierungsstörung (mildes ARDS: Quotient aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischer Sauerstoffkonzentration (p_aO_2/F_iO_2) 200 – 300 mmHg mit positivem endexpiratorischen Druck (PEEP) oder Continuous Positive Airway Pressure (CPAP) ≥ 5 cm H₂O; moderates ARDS: p_aO_2/F_iO_2 100 – 200 mmHg mit PEEP ≥ 5 cm H₂O; schweres ARDS: $p_aO_2/F_iO_2 \leq 100$ mmHg mit PEEP 5 cm H₂O)

1.2. Pathophysiologie des ARDS

Beim ARDS kommt es im Rahmen einer überschießenden Entzündungsreaktion zum Einstrom von neutrophilen Granulozyten (polymorphonukleäre Leukozyten [PMNs]) in die Lunge und zu einem Endothelschaden, der zu einer erhöhten

mikrovaskulären Permeabilität im Gefäßbett der Lunge führt⁷⁻⁹. Dadurch entsteht ein Lungenödem, das eine verminderte Oxygenierung des Blutes in der Lunge und somit die zuvor beschriebene Hypoxämie bedingt.

Nach der akuten Entzündungsreaktion mit Einwanderung von PMNs in die verschiedenen Lungenkompartimente folgt eine fibroproliferative Phase, in der hyaline Membranen ausgebildet werden und eine interstitielle Fibrose entsteht. Zum Schluss kommt es zur Resolution, bei der das Lungenödem resorbiert wird, die Entzündungszellen abgebaut werden und sich die mikrovaskulären Barrieren regenerieren⁹.

Das Epithel der Lungenalveolen besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen. Pneumozyten Typ I sind flache Zellen, deren Zellzahl nur 20% des Alveolarepithels beträgt, die aber 80% der Oberfläche der Lungenalveolen bilden⁸. Sie bilden die Struktur der Alveolen. Pneumozyten Typ II sind kubische Zellen, die 80% der alveolären Zellen ausmachen und die den Surfactant bilden, der die Oberflächenspannung der Alveolen vermindert. Pneumozyten Typ II haben die Fähigkeit zum Abtransport von Flüssigkeit aus dem Alveolarraum und können somit zur Resorption eines Lungenödems beitragen¹⁰. Sie stellen außerdem Vorläuferzellen dar, die sich in Pneumozyten Typ I umwandeln können.

In Lungenbiopsien, die in der akuten Phase des ARDS entnommen wurden, kommen Neutrophile, Makrophagen und Erythrozyten vor. Das Alveolarepithel ist beschädigt und es sind Anlagerungen von hyalinen Membranen und ein eiweißreiches Lungenödem vorhanden. In den Lungenkapillaren können Mikrothromben beobachtet werden, und elektronenmikroskopisch ist die Schädigung des Endothels sichtbar¹⁰.

Einwanderung polymorphonukleärer Leukozyten in die Lunge

Eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des ARDS spielt die Einwanderung von PMNs in die Lunge^{7,8,11}. Dabei besteht die primäre Aufgabe von PMNs in der Abwehr von Pathogenen. Durch Phagozytose können mikrobielle Antigene

internalisiert und mittels zytotoxischer Stoffe, die in das Phagosom abgegeben werden, zerstört werden¹². Im Rahmen einer überschießenden Immunantwort können diese zytotoxischen Stoffe jedoch in den extrazellulären Raum freigesetzt werden und somit das Gewebe schädigen¹³. Beim ARDS wird die Schädigung der Lunge wesentlich durch die exzessive Aktivierung von PMNs verursacht.

Bei der Einwanderung von PMNs in die Lunge akkumulieren PMNs im Gefäßbett der Lunge, haften an das Endothel und durchwandern die Gefäßwand, von wo aus sie das Interstitium der Lunge erreichen. Aus dem Lungeninterstitium erfolgt die transepitheliale Migration der PMNs in den Alveolarraum der Lunge.

Die Kapillaren der Lunge sind mit 2-15 µm sehr fein, weshalb PMNs, deren durchschnittlicher Durchmesser 6-10 µm beträgt, eine verlängerte Transitzeit durch die Lungengefäße haben und somit bereits unter physiologischen Bedingungen eine erhöhte Konzentration an PMNs in den Lungengefäßen vorliegt. Durch die Aktivierung von PMNs kommt es zur intrazellulären Polymerisation von Aktinfilamenten und die PMNs werden dadurch weniger verformbar, wodurch sich die Transitzeit durch die Lungenkapillaren verlängert und sich die Konzentration an PMNs im Gefäßbett der Lunge weiter erhöht.

In der transendothelialen Migration der PMNs kommt es zunächst zum Rolling der PMNs entlang der Gefäßwand und dann zur Adhäsion der PMNs am Endothel. Das Rolling der PMNs wird durch Selektine vermittelt¹⁴. L-Selektin wird physiologischerweise auf den meisten zirkulierenden Leukozyten exprimiert, während der entsprechende Ligand nur auf aktiviertem Endothel präsentiert wird. Diese Liganden für L-Selektin, P- und E-Selektin, werden auf aktiviertem Endothel exprimiert, um Leukozyten während der Inflammation zu rekrutieren. Integrine, die auf Leukozyten exprimiert werden, vermitteln die Adhäsion der PMNs am Endothel.

Der genaue Einfluss der verschiedenen Adhäsionsmoleküle auf das Krankheitsgeschehen des ARDS ist noch nicht abschließend geklärt, in

Lungenproben von Patienten, die an ARDS gestorben sind, konnte allerdings eine starke Hochregulation von Selektinen und Integrinen beobachtet werden¹⁵. Die Migration der PMNs durch das Endothel erfolgt entweder, indem interzelluläre Verbindungen (tight junctions) durchwandert werden, oder transzellulär¹⁶. PMNs, die am Endothel adhäreren, können das Zytoskelett von Endothelzellen beeinflussen und somit Veränderungen in den tight junctions induzieren, die die Migration durch die intrazellulären Verbindungen erleichtern.

Nachdem die PMNs das Interstitium durchwandert haben, folgt die transepitheliale Migration¹⁷. Dabei kommt es zunächst zur Adhäsion der PMNs an der basolateralen Seite des Epithels. Nach der initialen Adhäsion folgt die Migration der PMNs, die ausschließlich parazellulär, d.h. zwischen den Epithelzellen entlang der Zellmembran stattfindet, zur apikalen Seite des Epithels. Ein transzellulärer Weg wie bei der transendothelialen Migration scheint nicht vorzukommen, was daran liegen könnte, dass die Epithelzellen eine vielfach dickere Schicht als die Endothelzellen bilden.

Zytokine im ARDS

Zytokine sind Polypeptide, die von Zellen des Immunsystems sezerniert werden und die als lösliche Mediatoren eine wesentliche Rolle in der Zell-Zell-Interaktion spielen^{8,18}. Im ARDS werden proinflammatorische Zytokine in hohem Maße systemisch freigesetzt und verstärken die Entzündungsreaktion, indem sie das Endothel aktivieren und einen Einfluss auf zirkulierende und residente Leukozyten haben⁸. Tumor necrosis factor-Alpha (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) induzieren beispielsweise die Expression von Adhäsionsmolekülen im Endothel und haben so einen wesentlichen Einfluss auf die Einwanderung von Neutrophilen in die Lunge¹⁹. TNF- α und IL-6 werden vor allem von Immunzellen wie Makrophagen sezerniert, können aber auch von vielen anderen Zelltypen produziert werden^{20,21}.

Chemokine im ARDS

Eine besondere Klasse der Zytokine stellen die Chemokine dar, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Migration von PMNs in die Lunge nehmen^{7,8}. Chemokine sind Proteine, die die Migration von PMNs in die Richtung des Ortes mit der höchsten Konzentration von Chemokinen induzieren (Chemotaxis). Interleukin-8 (IL-8) ist ein Chemokin, das beim Menschen eine große Relevanz für den Verlauf des ARDS hat. So konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von IL-8 in der bronchoalveolären Lavage von ARDS-Patienten sowohl mit einem erhöhten Einstrom von PMNs in den Alveolarraum als auch mit einer erhöhten Mortalität einhergehen²². IL-8 wird im ARDS hauptsächlich von aktivierten Alveolarmakrophagen sezerniert und bindet an die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2, die auf PMNs exprimiert werden.

Es gibt bei Nagern kein Chemokin, das strukturell identisch zu IL-8 ist. Funktionell betrachtet besteht allerdings eine große Ähnlichkeit von IL-8 zu den Chemokinen Chemokin-Ligand 2/3 (CXCL2/3), auch als „macrophage inflammatory protein-2“ (MIP-2) bekannt, und Chemokin-Ligand 1 (CXCL1), das auch als „keratinocyte-derived chemokine“ (KC) bezeichnet wird^{23,24}. Beide Chemokine wirken über den Rezeptor CXCR2 und bewirken den Einstrom und die Aktivierung von PMNs^{25,26}. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Neutralisierung von CXCL2/3 und CXCL1 als auch die Blockade von CXCR2 den Einstrom Neutrophiler in die Lunge vermindert⁷. CXCL2/3 und CXCL1 werden von Alveolarmakrophagen und Pneumozyten Typ II produziert und bilden einen chemotaktischen Gradienten, der zur Einwanderung von CXCR2-exprimierenden Leukozyten führt^{27,28}.

Mikrovaskuläre Permeabilitätserhöhung im ARDS

Im ARDS kommt es zur Schädigung des Endothels, wodurch interzelluläre Lücken im Endothel gebildet werden⁸. Die Störung der endothelialen Integrität und die Beschädigung des Epithels führen zu einer mikrovaskulären Permeabilitätserhöhung, die den Einstrom proteinreicher Flüssigkeit in den Alveolarraum ermöglicht. Durch die Schädigung des Epithels nimmt außerdem

die Fähigkeit der Pneumozyten Typ II zur Flüssigkeitsresorption ab, was die Entstehung des Lungenödems zusätzlich begünstigt¹⁰.

Oxidativer Schaden im ARDS

In der Pathogenese des ARDS entstehen reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS). Die Freisetzung von ROS erfolgt dabei einerseits durch PMNs, andererseits können ROS in der Lunge auch durch exogene Ursachen, wie zum Beispiel durch künstliche Beatmung mit hohen Sauerstoffkonzentrationen, entstehen. ROS vermitteln die Oxidation von Nucleinsäuren, Protein und Lipiden und führen somit zu Gewebeschäden²⁹.

1.3. Hämoxygenase-1

Enzymologie

Die Hämoxygenase katalysiert den Abbau von Häm zu Eisen, Kohlenmonoxid (CO) und Biliverdin (siehe Abbildung 1-1)³⁰. Diese Reaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Abbau von Häm und benötigt molekularen Sauerstoff und Reduktionsäquivalente über NADPH. Es gibt zwei Isoenzyme der Hämoxygenase. Die Hämoxygenase-2 (HO-2) wird konstitutiv exprimiert, während die Hämoxygenase-1 (HO-1) ein induzierbares Enzym ist, das unter physiologischen Bedingungen nur sehr gering exprimiert wird (mit Ausnahme der Milz, wo der Erythrozytenabbau stattfindet und daher große Mengen an Hämoglobin umgesetzt werden). Die Existenz des Isoenzym Hämoxygenase-3 wird diskutiert, aber wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine durch Pseudogene kodierte Variante der HO-2³¹.

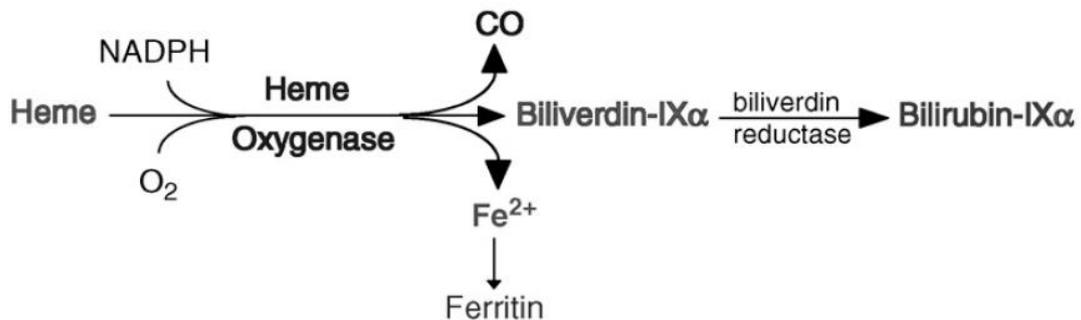


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Häm-Abbaus durch die katalytische Funktion der HO-1. Die HO-1 katalysiert den Abbau von Häm zu Biliverdin, CO und Eisen, wobei NADPH und O₂ umgesetzt wird. Biliverdin wird anschließend durch die Biliverdin-Reductase zu Bilirubin reduziert. Das freiwerdende Eisen stimuliert die Synthese von Ferritin. NADPH: Nicotinamidadeninucleotidphosphat, O₂: molekularer Sauerstoff, CO: Kohlenstoffmonoxid, Fe²⁺: zweiwertiges Eisen. Modifiziert nach Fredenburgh 2007³².

Es ist bekannt, dass die HO-1 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und im Eisenstoffwechsel spielt³³. Die vermehrte Transkription der Hämoxxygenase-1 wird durch verschiedene Stimuli ausgelöst, von denen viele mit oxidativem Stress korreliert sind^{30,34}. Zum einen natürlich durch ein erhöhtes Angebot des Substrats Häm, des Weiteren durch NO, Hämin, bakterielle Endotoxine, proinflammatorische Zytokine, Veränderungen im Sauerstoffpartialdruck über oder unter den physiologischen Normalbereich, Ischämie/Reperfusionsschaden, Zigarettenrauch und viele andere Agentien. Die Regulation der HO-1 durch diese Stimuli findet auf Transkriptionsebene statt.

Die wesentliche Rolle der HO-1 für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und die wesentliche antioxidative Wirkung der HO-1 kann man in zwei Fällen überlieferter HO-1-Defizienz bei Menschen sehen³⁵⁻³⁷. Die beschriebenen Patienten zeigen eine chronische Entzündung und eine hämolytische Anämie, persistierenden Endothelschaden, der durch eine erhöhte Suszeptibilität für oxidativen Stress erklärt wird und hepatische und renale Eisenablagerungen. Mäuse, bei denen das HO-1-Gen vollständig deletiert wurde, sterben entweder bereits intrauterin oder zeigen eine schwere chronische Inflammation³³.

Bei vielen pulmonalen Erkrankungen wie chronischer obstruktiver Lungenerkrankung, zystischer Fibrose, ARDS oder Asthma bronchiale, die mit einer Entzündungsreaktion einhergehen, wird die HO-1 im Lungengewebe hochreguliert. In der Lunge wird die HO-1 in verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter Alveolarmakrophagen und Pneumozyten Typ II³².

Anti-inflammatorische und zytoprotektive Eigenschaften der Hämoxygenase-1

Die HO-1 ist ein sogenanntes Stressprotein, das eine wichtige Rolle bei zelleigenen Abwehrmechanismen spielt^{29,30,38}. Das bedeutet, dass Zellen, die unphysiologischen Konditionen ausgesetzt sind, mit einer Steigerung der Expression der HO-1 als Kompensationsmechanismus reagieren, um die zelluläre Homöostase aufrecht zu halten.

Der genaue Mechanismus des HO-vermittelten Zellschutzes ist nicht genau geklärt. Man geht davon aus, dass die zytoprotektiven Eigenschaften vor allem durch die Metaboliten der HO-1, Biliverdin, Eisen und CO vermittelt werden³⁰. Außerdem scheint auch der durch die HO-1 vermittelte Abbau von Häm eine anti-inflammatorische Wirkung zu haben.

Für CO werden anti-inflammatorische, antiproliferative, antiapoptotische und vasodilatatorische Effekte beschrieben³⁸. So konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Mäuse, die mit CO in geringen Dosen vorbehandelt wurden, nach Induktion einer systemischen Inflammationsreaktion durch intraperitoneale Applikation von LPS weniger proinflammatorische Zytokine und vermehrt anti-inflammatorische Zytokine im Serum aufwiesen³⁹. In derselben Studie wurde *in vitro* bei Makrophagen ebenfalls die Reduktion proinflammatorischer Zytokine nach Vorbehandlung mit CO demonstriert. Eine vasodilatatorische Wirkung konnte bei isolierten Aorten nachgewiesen werden⁴⁰.

CO tritt im Körper vor allem gebunden an Hämoglobin in Erythrozyten auf (CO-Hb) und stammt vor allem aus dem endogenen Abbau von Häm durch die Hämoxygenase im Rahmen des Hämoglobin-Umsatzes^{38,41}. Ab einem Gehalt

von 20% CO-Hb kommt es zu ersten Symptomen einer CO-Vergiftung und der Tod tritt bei einem Gehalt von CO-Hb zwischen 50 und 80% auf. Die protektiven Einflüsse von CO werden dagegen schon *in vivo* bei einer sehr geringen CO-Konzentration von 250 ppm in der Atemluft erreicht⁴².

Biliverdin wird schnell durch die Biliverdin-Reduktase in Bilirubin umgewandelt. Bilirubin hat eine starke antioxidative Wirkung⁴³. Durch diese antioxidative Wirkung vermittelt Bilirubin Schutz vor oxidativem Stress hat somit eine anti-inflammatorische Wirkung. So konnten Zellen sowohl durch HO-1-Induktion mittels Hämin als auch durch Inkubation mit Bilirubin vor oxidativem Stress geschützt werden⁴⁴. Bei Ratten mit LPS-induzierter akuter pulmonaler Inflammation verbesserte die intravenöse Gabe von Biliverdin die Überlebensrate deutlich und führte zu einer deutlich verminderten Entzündungsreaktion⁴⁵.

CO und Biliverdin/Bilirubin vermitteln ihre anti-inflammatorischen Eigenschaften durch unterschiedliche Mechanismen, und es hängt von der Art des inflammatorischen Stimulus ab, wie stark der Einfluss der einzelnen Metaboliten ist. In einer Studie mit Ratten, bei denen entweder das Herz oder die Niere transplantiert wurde, konnten durch CO-Inhalation und intraperitoneale Applikation von Biliverdin positive synergistische Effekte erzielt werden, die zu einer wesentlich besseren Überlebensrate der Transplantate führten als die alleinige Gabe von CO oder Biliverdin⁴⁶.

Der Abbau von Häm, das z. B. bei Zellschädigung oder Hämolyse in großen Mengen freigesetzt wird, ist ein weiterer Mechanismus, durch den die HO-1 anti-inflammatorische Eigenschaften ausüben kann. Häm induziert eine erhöhte Gefäßpermeabilität, die Expression von Adhäsionsmoleküle und die Rekrutierung von Leukozyten und führt somit zu einer starken Entzündungsreaktion⁴⁷. Die HO-1 verhindert durch den Häm-Abbau diese Häm-induzierte Inflammation.

Beim Häm-Abbau wird neben CO und Biliverdin auch Eisen frei, das potentiell prooxidativ wirken kann. Es wird spekuliert, dass dieses Eisen indirekt protektive

Effekte vermittelt, in dem es die Synthese von Ferritin stimuliert und somit freies Eisen bindet^{48,49}.

Die prooxidative Wirkung von Eisen ist einer der Gründe, weshalb man davon ausgeht, dass HO-1-Aktivität oberhalb einer gewissen Grenze zu toxischen Effekten führen kann. In Hamster-Fibroblasten wurde demonstriert, dass die zytoprotektive Wirkung der HO-1 bei starker Überexpression der HO-1 ins Gegenteil umschlägt, da die Akkumulation von freiem Eisen zytotoxisch wirkt⁵⁰. Es wurde sogar gezeigt, dass die Inhibition oder Abwesenheit der HO-1 bei Mäusen zu einem verminderten Lungenschaden durch Hyperoxie führt, was darauf zurückgeführt wurde, dass aufgrund der fehlenden HO-1-Wirkung geringere Mengen an reaktivem Eisen in der Lunge gebildet werden⁵¹. Auch Bilirubin und CO können in zu hohen Konzentrationen toxisch wirken, was als ein möglicher Grund dafür angesehen wird, dass die HO-1 nicht ständig exprimiert wird, sondern erst in Situationen mit zellulären Stress induziert werden muss⁵².

Neben der oben genannten Effekte der HO-1, die durch ihre katalytische Aktivität zustande kommen, werden auch nicht-katalytische Effekte diskutiert. Es wurde beobachtet, dass die HO-1 in hypoxischen Zellen zum Teil aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum in den Zellkern wanderte und dort auf Transkriptionsfaktoren wirkte, die mit oxidativem Stress assoziiert sind⁵³. Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass die HO-1 auch durch die Translokation in den Zellkern bei oxidativem Stress zytoprotektiv wirkt, in dem die Transkription entsprechender Proteine beeinflusst wird.

Rolle der Hämoxygenase-1 im ARDS

Als Enzym mit anti-inflammatorischer Wirkung spielt die HO-1 im Krankheitsverlauf des ARDS eine protektive Rolle. In Tierversuchen konnten durch die Induktion der HO-1 oder die Behandlung mit Metaboliten der HO-1 wie CO oder Biliverdin anti-inflammatorische Effekte in LPS-induzierten Modellen von akutem Lungenversagen erreicht werden^{45,54,55}. Die HO-1 stellt somit ein mögliches therapeutisches Ziel in der Behandlung des ARDS da. Mögliche

Ansätze sind die pharmakologische Induktion der HO-1, die Überexpression der HO-1 durch organspezifische Gentherapie oder die Substitution von CO, beispielsweise durch Moleküle, die im Körper CO abgeben (transition-metal carbonyl CO-releasing molecules, CORMs)⁵⁶.

1.4. Fragestellungen der Arbeit

Als Krankheitsbild mit hoher Letalität und ohne verfügbare kausale Therapie ist die Suche von Therapieoptionen für das ARDS eine wichtige Forschungsaufgabe. Obwohl einige Studien den protektiven Effekt der HO-1 im ARDS nahelegen, ist der genaue Einfluss der HO-1 auf das Krankheitsgeschehen der akuten pulmonalen Inflammation noch nicht geklärt. Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung der HO-1 in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation zu untersuchen und somit den Stellenwert einer therapeutischen Intervention durch Beeinflussung der HO-1 zu evaluieren.

Folgende Fragestellungen wurden mit dieser Arbeit untersucht:

- Welchen Einfluss hat die HO-1 auf die PMN-Migration in die Lunge im Rahmen der LPS-induzierten akuten Inflammation?
- Welchen Einfluss hat die HO-1 auf die LPS-induzierte Steigerung der mikrovaskulären Permeabilität?
- Welchen Einfluss hat die HO-1 auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in den Alveolarraum?

Dabei wurde zwischen dem Einfluss der myeloiden und nicht-myeloiden HO-1 differenziert, indem Wildtyptiere mit HMOX flox/flox-Mäusen, bei denen die myeloide HO-1 nicht exprimiert wird, verglichen wurden. Die HO-1 wurde dabei pharmakologisch stimuliert bzw. inhibiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Versuchstiere

Für die *in vivo* Versuche wurde ein konditionales Mausmodell mit zellspezifischer Deletion des HO-1-Gens auf myeloiden Zellen verwendet. Dafür wurden Tiere der Linie HO-1 (HMOX)^{flox/flox} (Alexander Fleming, Biomedical Sciences Research Centre, Varkiza, Griechenland) mit Tieren der Linie B6.129P2-Lyz2^{tm1(cre)lfo}/J, Stock # 004781 (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) gekreuzt. Die erfolgreiche Kreuzung wurde mittels Genotypisierung nachgewiesen.

Als Kontrolltiere wurden Wildtypiere der Linie C57/BL6 (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Genehmigung aller in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgte durch das Regierungspräsidium Tübingen mit der Genehmigungsnummer A 4/12. Die Tiere werden in Käfigen zu ca. vier Stück bei einer Luftfeuchtigkeit von 45 bis 55 % und einer Raumtemperatur von 23 bis 25 °C gehalten. Ein 12-stündiger hell-dunkel Zyklus war gewährleistet. Bei Durchführung der Versuche waren die Tiere acht bis zwölf Wochen alt und 20 bis 28 g schwer.

Geräte

| Produktbezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| Absaugpumpe Vario Vaccubrand BVC 21 | Vacuubrand, Wertheim |
| Durchflusszytometer BD FACSCanto II Flow Cytometer | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Eismaschine AF-10 | Scotsman, Sprockhoevel |
| Gewebeinfiltrationsautomat TP1050 | Leica biosystems, Nussloch |
| Histoembedder EG 11160 | Leica biosystems, Nussloch |
| Homogenisator Precellys 24 | PEQLAB, Erlangen |
| Inkubationswasserbad Typ 1003 | GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel |

| | |
|-------------------------------|---|
| Labor-pH-Meter 526 | WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim |
| Mehrkanalpipette (3114000158) | Eppendorf, Hamburg |
| Mikroskop Leica DM-IRB | Leica, Wetzlar |
| Mikrowelle Cookmate | DEAWOO, Butzbach |
| Multipette Plus (4981000.019) | Eppendorf, Hamburg |
| Photometer GENios | Tecan, Crailsheim |
| Photometer Ultraspec 3000 pro | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Pinzetten (BD312R, BD311R) | Aesculap, Tuttlingen |
| PipetBoy acu (155000) | INTEGRA Bioscience, Fernwald |
| Pipetten (0.1-2500 µl) | Eppendorf, Hamburg |
| Plate washer Columbus Plus | Tecan, Crailsheim |
| Rotationsmikrotom RM 2235 | Leica biosystems, Nussloch |
| Scheren (BC590R, BC060R) | Aesculap, Tuttlingen |
| Thermoschüttler AK 82 | INFPORS AG, Bottmingen (CH) |
| UltraschallSonoplus GM 70 | Bandelin electronic, Berlin |
| Vernebler MICRO-A-I-R U22 | OMRON Healthcare, Illinois (USA) |
| Vortex K-55-GE | Bender und Hobein AG, Zürich (CH) |
| Waage HR-120-EC | A&D Instruments, Ltd., Ahrensburg |
| Waage Scout II | Ohaus, Kirchheim |
| Wärmeplatte HI 1220 | Leica biosystems, Nussloch |
| Wasserbad HI 1210 | Leica biosystems, Nussloch |
| Zentrifuge 5417R | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge Megafuge 1.0R | Haraeus, Hanau |

Verbrauchsmaterialien

| Produktbezeichnung | Hersteller |
|--|--------------------------------|
| BD Cytometer Setup&Tracking Beads (641319) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Cell culture tube 12 ml, steril (163160) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Combitips Plus 10 ml (0030069.269) | Eppendorf, Hamburg |
| Deckgläser (01-2460/1) | R.Langensbrinck, Emmendingen |
| Einbettkassetten Rotilapo (K.113.1) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Einweg-Pasteurpipetten (EA70.1) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Färbeeinsatz (11-0002) | R.Langensbrinck, Emmendingen |
| Färbeküvette (11-0001) | R.Langensbrinck, Emmendingen |
| GAZIN Mullkompressen (18501) | Lohmann & Rauscher, Neuwied |
| GAZIN Mullkompressen steril (13620) | Lohmann & Rauscher, Neuwied |
| Glas Röhrchen No.2775/6 75 x 12 mm | Assistent, Sondheim |
| Glaspasteurpipetten 150 mm | WU, Mainz |
| Handschuhe DermaClean (PFC4303971) | Ansell, München |

| | |
|---|---------------------------------|
| ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen (H-4000) | Vector Labs, Peterborough (UK) |
| Kanüle Safty-Multifly 21G (851638235) | Sarstedt, Nürnberg |
| Kanülen Microlance 20 G (301300) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Kanülen Microlance 24 G (304100) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Kanülen Microlance 25 G (300400) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Kanülen Microlance 27 G (302200) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Kryoröhrchen 1.8 ml Nunc (368632) | Thermo Scientific, Bonn |
| Mikrotiterplatte Mikroplate (655101) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Mikrotiterplatte Nunc Maxisorp (442404) | Thermo Scientific, Bonn |
| Mikrotomklinge S35 | Feather, Tokjo (J) |
| Multi-SafeSeal Tubes (7083.1) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Nähgarn Mercifil No 50 (M3541) | Amann und Söhne, Bönningheim |
| Objekträger (03-0004) | R.Langenbrinck, Emmendingen |
| Objekträger Superfrost Plus (03-0060) | R.Langenbrinck, Emmendingen |
| Parafilm | Parafilm |
| Petrischalen Cellstar (627160) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Petrischalen Cellstar (628160) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Petrischalen Cellstar (633171) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Pipettenspitzen 10 µl (70.1115) | Sarstedt, Nürnberg |
| Pipettenspitzen 200 µl (0030.000.870) | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen 200 µl (70760002) | Sarstedt, Nürnberg |
| Pipettenspitzen 1000 µl (686290) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Pipettenspitzen 2000 µl (K315.1) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Polypropylenröhrchen 15 ml (188271) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Polypropylenröhrchen 50 ml (352070) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Polystyrenröhrchen 5 ml (352052) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Quarzglasküvetten (105-200-QS) | Hellma, Müllheim |
| Precellys Ceramic Beads 1,4 mm (120416-890) | PEQLAB, Erlangen |
| Micro packaging vials, 2 ml (1065637) | PEQLAB, Erlangen |
| Micro packaging vial closure (1066460) | PEQLAB, Erlangen |
| Reaction-tubes 1.5 ml (616201) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Safe-lock tubes 0.5 ml (0030121023) | Eppendorf, Hamburg |
| Spritze 1 ml (300013) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Spritze Injekt 10 ml (4606108V) | Braun, Melsungen |
| Spritze Injekt 2 ml (4606027V) | Braun, Melsungen |
| Spritze Injekt 5 ml (4606051V) | Braun, Melsungen |
| Stripetten 1 ml (356521) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Stripetten 5 ml (356543) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Stripetten 10 ml (356551) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Stripetten 25 ml (356525) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Transwell Plate 24 well (3472-Clesar) | Corning Incorporated, Wiesbaden |

| | |
|--|------------------------------|
| Venenkatheter Insyte 22 G (381223) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Zählkammer C-Chip (DHC-N01) | Digital Bio, Seoul (ROK) |
| Zellsiebe Cell Strainer 70 µm (352350) | Becton&Dickinson, Heidelberg |

Chemikalien

| Produktbezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| Chloroform CH-Cl ₃ (C2432) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| DAB Chromogen (S3000) | Dako, Hamburg |
| EDTA (ED4S) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Evans blue (206334-10G) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Formamid (F9037) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| H ₂ SO ₄ (100731) | Merck, Darmstadt |
| Hämin (H9039-1G) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| KCl (4936) | Merck, Darmstadt |
| KH ₂ PO ₄ (4873) | Merck, Darmstadt |
| Na ₂ HPO ₄ (6580) | Merck, Darmstadt |
| NaCl (106404) | Merck, Darmstadt |
| NaHCO ₃ (K10720529) | Merck, Darmstadt |
| NH ₄ Cl (A0988) | AppliChem, Darmstadt |
| K ₂ H PO ₄ | Lieferant (HO-Aktivität) |
| NaH ₂ PO ₄ | Lieferant (HO-Aktivität) |
| MgCl | Lieferant (HO-Aktivität) |
| Sn(IV) Protoporphyrin IX dichloride (Sn749-9) | Frontier Scientific, Logan (U.S.IEHEA.) |
| Chloroform CH-Cl ₃ (C2432) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Glucose-6-Phosphat (G7772) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| NADPH (N1630) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G4134) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| PBS (D5652) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| PBS ⁻ (D8537) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| PFA 4% (P6148) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Wasserstoffperoxid 30% (108597) | Merck, Darmstadt |

Medien

| Produktbezeichnung | Hersteller |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Avidin Blocking Kit (SP-2001) | Vector Labs, Peterborough (UK) |
| Bluing Reagent (7301) | Thermo Scientific, Bonn |

| | |
|--|--|
| Bovine Serum Albumine BSA (A7906-100g) | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Diff-Quick (130832) | Medion Diagnostics, Düdingen (CH) |
| DMSO (D5879) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Ethanol absolut (A3678) | AppliChem, Darmstadt |
| Eukitt (03989) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Formalin 4% (A3697) | AppliChem, Darmstadt |
| FSGO Gelatin (G7765) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Hämatoxylin (GHS316) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| ImmunoSet HO-1 (mouse) ELISA development set (ADI-960-071) | Enzo Life Sciences, Hines Drive (U.S.A.) |
| KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit (07-KK7352-01) | PEQLAB, Erlangen |
| LPS (L6011) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Paraffin Rotiplast (6642.5) | Carl Roth, Karlsruhe |
| BCA Protein Assay Kit (23225) | Thermo Scientific, Bonn |
| Reagent Diluent (DY995) | R&D Systems, Wiesbaden |
| Recombinant murine MIP-2 (25015) | PeptoTech, Hamburg |
| Stop Solution (80-184) | Enzo Life Sciences, Hines Drive (U.S.A.) |
| Substrat Solution (DY999) | R&D Systems, Wiesbaden |
| Triton X-100 (A4975) | AppliChem, Darmstadt |
| Triton X-100 (T8787) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Türk'sche Lösung (109277) | Merck, Darmstadt |
| Tween 20 (A4974) | AppliChem, Darmstadt |
| Unmasking Solution (H-3300) | Vector Labs, Peterborough (U.K.) |
| Xylol (9713.3) | Carl Roth, Karlsruhe |

Enzyme

| Produktbezeichnung | Hersteller |
|------------------------|----------------------------|
| Collagenase XI (C7657) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| DNase (D4527) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Hyaluronidase (H3506) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

Medikamente

| Produktbezeichnung | Hersteller |
|---------------------------------|------------------|
| Atropinsulfat 0.5 mg/ml | Ratiopharm, Ulm |
| Desinfektionsspray Softasept | Braun, Melsungen |
| Heparin-Natrium 25000 I.E./5 ml | Ratiopharm, Ulm |
| Ketamin 50mg/ml | Ratiopharm, Ulm |
| NaCl 0.9% 10 ml | Braun, Melsungen |

| | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| NaCl 0.9% 100 ml | Fresenius Kabi, Bad Homburg |
| Rompun 2% (25ml Xylazin) 20mg/ml | Bayer, Leverkusen |

Antikörper

| Produktbezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| 7/4 FITC (MCA771F) | AbD Serotec, Düsseldorf |
| Biotinylated rabbit anti rat (BA-4001) | Vector Labs, Peterborough (UK) |
| CD45 PerCP (557235) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| DuoSet ELISA IL-6 (DY 406) | R&D Systems, Wiesbaden |
| DuoSet ELISA KC (DY 453) | R&D Systems, Wiesbaden |
| DuoSet ELISA MIP-2 (DY 452) | R&D Systems, Wiesbaden |
| DuoSet ELISA TNF- α (DY 410) | R&D Systems, Wiesbaden |
| Gr1-633 | Lymphocyte Culture Center Core, University of Virginia, Charlottesville (USA) |
| IgG 2a FITC (553929) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| IgG 2b APC 553991) | Becton&Dickinson, Heidelberg |
| Rat anti mouse neutrophils (MCA771GA) | AbD Serotec, Düsseldorf |
| Vectastain ABC-KIT (PK-4004) | Vector Labs, Peterborough (UK) |

2.2. Induktion einer pulmonalen Inflammation im Mausmodell

Die pulmonale Inflammation wurde durch Inhalation von Lipopolysacchariden (LPS) von *Salmonella enteritidis* ausgelöst. Durch Lösung in NaCl 0,9% entstand eine Lösung mit der Konzentration 0,5 g LPS/ml, die anschließend vernebelt wurde. Die Verneblung dauerte ca. 30 Minuten. Lipopolysaccharide als Oberflächenbestandteil gramnegativer Bakterien lösten eine pulmonale Inflammation aus, die den Pathomechanismus des ARDS simulierte.

Vier bis acht Mäuse wurden in eine Plexigaskammer gesetzt, die durch Vernebelung der LPS-Lösung über einen zuführenden Schlauch mit LPS-Aerosol gefüllt wurde (siehe Abbildung 2-1). Über einen abführenden Schlauch wurde ein durch Wasserfluss erzeugter Unterdruck angelegt. Dadurch konnte ein

konstanter Strom der LPS-Aerosole vom Vernebler durch die Kammer gewährleistet werden.

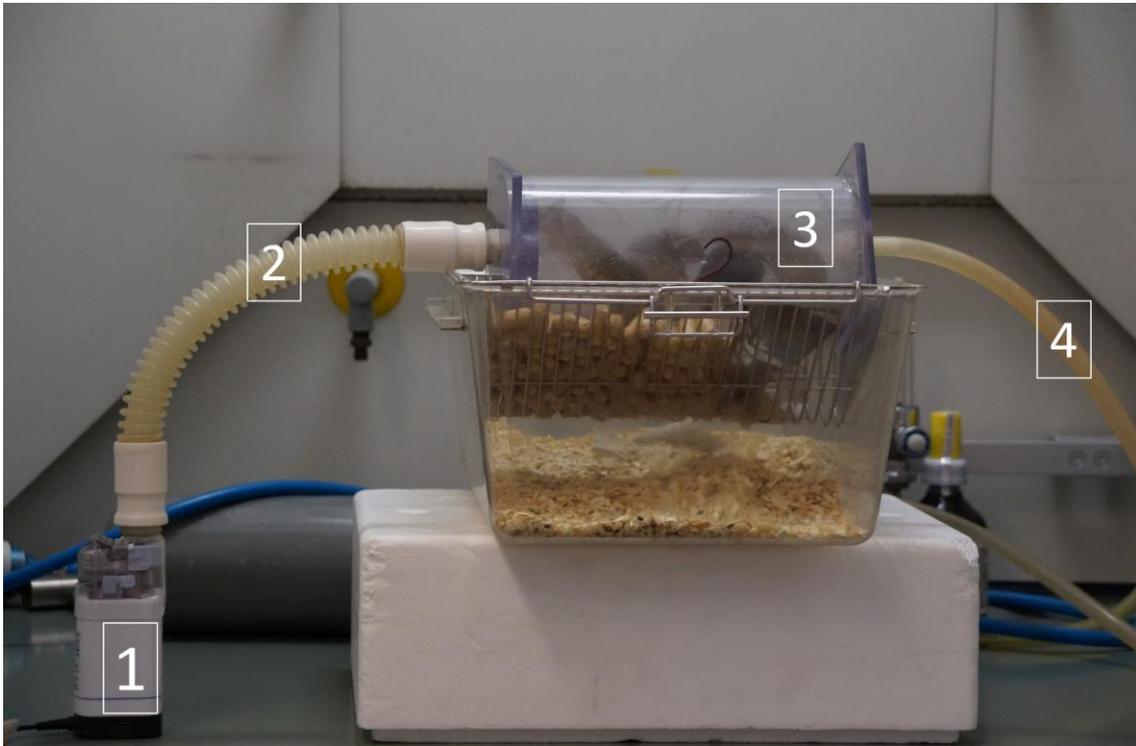


Abbildung 2-1: Vernebelung von LPS-Lösung. 1.) Vernebler, 2.) zuführender Schlauch, 3.) Plexigalkammer, 4.) abführender Schlauch

2.3. Induktion und Inhibition der Hämoxygenase-1 im Mausmodell

Die Induktion der HO-1 in den Versuchstieren erfolgte durch intraperitoneale Applikation von Hämin 24 Stunden vor Induktion der pulmonalen Inflammation durch LPS-Inhalation (siehe Abbildung 2-2). Die Behandlung mit Hämin führt zur Erhöhung der mRNA- und Proteinlevel der HO-1⁵⁷.

Durch die zusätzliche Gabe von Zinn-Protoporphyrin (SnPP) eine Stunde vor LPS-Inhalation wurde die HO-1 inhibiert. SnPP hat eine dem Hämin ähnliche Struktur und erhöht ebenfalls die Transkription der HO-1, führt aber zu einer

kompetitiven Hemmung des Enzyms⁵⁸. Vorversuche zeigten, dass der inhibitorische Effekt von SnPP auf die HO-1 durch vorhergehende Induktion der HO-1 durch Hämin verstärkt wird.

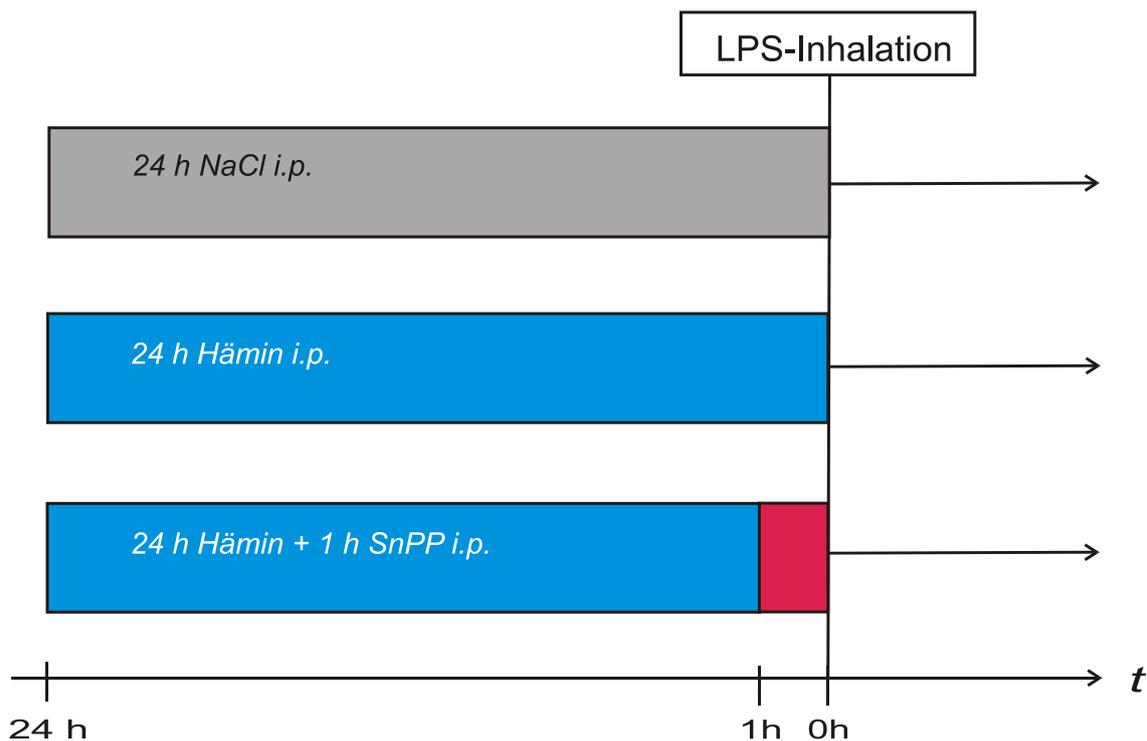


Abbildung 2-2: Versuchsprotokoll der HO-1-Induktion bzw. HO-1-Inhibition (von oben nach unten: Kontrollgruppe, HO-1 Induktion, HO-1 Inhibition). Zur HO-1-Induktion wurde 24 Stunden vor LPS-Inhalation Hämin intraperitoneal appliziert. Die Hemmung der HO-1 erfolgte durch zusätzliche Gabe von SnPP eine Stunde vor LPS-Inhalation. In der Kontrollgruppe wurde lediglich die entsprechende Trägerlösung verwendet.

Zur HO-1-Induktion wurden 80 μmol Hämin je Kilogramm Körpergewicht Maus injiziert. 260,8 mg Hämin in Pulverform wurden in einem Milliliter einmolarer NaOH-Lösung aufgelöst und dann auf das 50fache Volumen mit NaCl 0,9%-Lösung verdünnt. Davon wurden 10 μl pro Gramm Körpergewicht appliziert.

SnPP wurde in der Dosierung 50 μmol je Kilogramm Körpergewicht appliziert. 75 mg des Pulvers wurden in einem Milliliter einmolarer NaOH-Lösung aufgelöst und

dann mit NaCl 0,9%-Lösung auf 20 ml verdünnt. Von der erhaltenen Lösung wurden 10 µl je Gramm Körpergewicht der Maus verwendet.

In der Kontrollgruppe wurde dieselbe Trägerlösung wie für die Applikation von SnPP verwendet, dabei wurden ebenfalls 10 µl je Gramm Körpergewicht der Maus appliziert.

2.4. Differentialblutbild

Aus einer Schwanzvene der Maus wurde durch Punktion mit einer Kanüle Blut gewonnen. Um die Anzahl der Leukozyten pro ml Blut zu ermitteln, wurden 10 µl des Bluts mit 90 µl Türkscher Lösung verdünnt und in einer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Auf einem Objektträger wurde mit einem weiteren Blutstropfen ein Blutausschlag angefertigt, der mit dem Färbeset „Diff Quick®“ entsprechend der Herstellerangaben gefärbt und getrocknet wurde. Diese Präparate wurden mikroskopiert und die verschiedenen Leukozytengruppen differenziert. Pro Präparat wurden 100 Leukozyten ausgezählt.

2.5. Erstellung immunhistochemischer Lungengewebspräparate

Gewinnung histologischer Lungengewebspräparate

24 Stunden nach Beginn der Induktion einer pulmonalen Inflammation durch LPS-Inhalation erfolgte die Entnahme der Lunge und die Fixierung in Formalin.

Zur Betäubung der Tiere verwendete Narkose setzte sich aus 200 µl Ketamin, 50 µl Rompun, 40 µl Atropin und 710 µl NaCl 0,9 % zusammen. Je Maus wurden 300 µl dieser Mischung intraperitoneal appliziert.

Nach erfolgter Betäubung wurden alle vier Extremitäten der Tiere mit Kanülen fixiert, so dass die Maus gestreckt in Rückenlage lag. Der Kopf wurde nach hinten überstreckt, das Fell abpräpariert und das Peritoneum eröffnet. Durch kaudale

Eröffnung des Diaphragmas wurde ein Pneumothorax ausgelöst, wodurch der Thorax eröffnet werden konnte, ohne die Lunge zu beschädigen. Nach infrahepatischer Durchtrennung der Vena cava posterior wurden langsam mit einer Spritze drei ml PBS⁻ in den rechten Ventrikel des Herzens infundiert, um die Lungengefäße zu durchspülen und von Blut zu befreien. Es erfolgte die Freilegung der Trachea und Intubation mit einer Venenverweilkanüle. Die Kanüle wurde mit einem Faden fixiert und die Lunge der Maus mit Formalin befüllt. Ein mit 20 ml Formalin befülltes Reservoir wurde durch ein Schlauchsystem mit der intratrachealen Kanüle verbunden, so dass das Formalin mit definiertem hydrostatischem Druck die luftleitenden Wege der Maus flutete. Die Lunge wurde von außen mit Formalin befeuchtet und anschließend mit einem Tupfer bedeckt, der mit Formalin feucht gehalten wurde.

Nach 10 Minuten erfolgte die Entnahme der Lunge. Dabei wurde das Herz mit den mediastinalen Strukturen und beiden Lungenlappen aus dem Thorax geholt und danach der große linke Lungenlappen von diesem Herz-Lungen-Paket abpräpariert und in einem Körbchen in Formalin eingelegt. Der kleinere linke Lungenlappen wurde zusammen mit der kompletten rechten Lunge als zweites Paket abpräpariert und ebenfalls in ein zweites Körbchen in Formalin gegeben.

Die entnommenen Organe wurden 24 Stunden in Formalin eingelagert, danach erfolgte die Inkubation in 70% Alkohol für eine Stunde. Die Organe wurden in den Gewebeeinfiltrationsautomat gegeben, wo in aufeinanderfolgenden Schritten das Gewebe entwässert und mit Paraffin infiltriert wurde. Nach Einbettung des paraffinierten Organs in Paraffinblöckchen wurden mit dem Rotationsmikrotom fünf µm dicke Organschnitte erstellt, die auf Objektträgern fixiert wurden.

Immunhistochemische Färbung von PMNs

Die Lungenschnitte wurden entparaffiniert und rehydratisiert. Dazu wurden die Objektträger nacheinander in Xylol, einer absteigenden Alkoholreihe und dann in destilliertem Wasser inkubiert, um das hydrophobe Paraffin durch Wasser zu ersetzen.

Durch Inkubation mit 0,45% H₂O₂ in Methanol für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase. Die Organschnitte wurden in einer „unmasking solution“ für 20 Minuten in der Mikrowelle gekocht, um Antigene, die durch die Formalinfixierung maskiert wurden, wieder zugänglich zu machen.

Es folgte die Inkubation mit „Avidin Blocking Solution“ in 0,5 % FSGO/PBS⁻ und Normalserum von Hasen für 60 Minuten bei Raumtemperatur, um endogenes Biotin zu blockieren und um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers mit dem Organschnitt zu vermeiden.

Die Präparate wurden mit dem Primärantikörper inkubiert. Dabei wurde ein „Rat anti mouse“-Antikörper verwendet, der gegen PMNs gerichtet ist. Außerdem wurde für jeden Schnitt eine IgG-Kontrolle mit einem „Normal Rat IgG“-Antikörper und eine Negativkontrolle angefertigt. Der entsprechende Antikörper wurde zusammen mit der „Biotin Blocking Solution“ in 0,5 % FSGO/PBS⁻ und Normalserum von Hasen gelöst. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Tag wurden die Präparate in 0,5 % FSGO/PBS⁻ gespült und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Sekundärantikörper „Rabbit anti rat IgG“ in 0,5 % FSGO/PBS⁻ und Normalserum von Hasen inkubiert. Danach wurden die Präparate in 0,5 % FSGO/PBS⁻ gewaschen und mit „ABC-Lösung“ (Avidin-Biotin-Komplex, der mit Peroxidase markiert ist) für 30 Minuten inkubiert. Nach Waschen der Präparate in PBS⁻ wurden sie mit DAB-Lösung (3,3'-Diaminobenzidin) mit Wasserstoffperoxid für fünf Minuten inkubiert. Dies führte zur Braunfärbung der Antikörper-markierten PMNs. Die Präparate wurden nach Spülung mit destilliertem Wasser mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit „Bluing Reagent“ gebläut. Durch Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe und anschließender Inkubation in Xylol erfolgte die Entwässerung der Präparate. Die Präparate wurden in Eukitt eingebettet.

Immunfluoreszenzfärbung der Hämoxygenase-1

Die Präparate wurden zunächst, wie bei der PMN-Färbung zuvor beschrieben, entparaffiniert und gewässert. Anschließend wurden die Präparate 20 Minuten in einer „unmasking solution“ in der Mikrowelle gekocht und zur Permeabilisierung für 10 Minuten in 0,1 % Triton X-100 (in PBS⁻ gelöst) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation für 60 Minuten in „blocking Solution“, die aus 0,1 % Triton X-100 und 5 % BSA in PBS⁻ bestand.

Um das Zytoskelett anzufärben, wurden die Präparate mit dem Primärantikörper „Goat polyclonal to von Willebrand Factor“ für eine Stunde inkubiert. Nach Waschen mit PBS⁻ erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper „Alexa Fluor 594 Donkey Anti-Goat IgG (H+L) Antibody“ für ebenfalls eine Stunde. Anschließend wurden die Präparate wieder in „blocking Solution“ (s.o.) inkubiert.

Um die HO-1 spezifisch anzufärben, wurde der Primärantikörper „HO-1, rabbit pAb“, verwendet. Für die Isotypkontrolle wurde der IgG-Antikörper „normal rabbit IgG“ benutzt, während die Negativkontrolle durch Inkubation mit Trägerlösung ohne Antikörper erfolgte. Nach Inkubation über Nacht wurden die Präparate gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper „Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody“ für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Präparate eingebettet, wobei zur Blaufärbung der Zellkerne „Roti-Mount FluorCare DAPI“ verwendet wurde.

2.6. Quantifizierung der Einwanderung von PMNs in die verschiedenen Kompartimente der Lunge *in vivo*

Mittels des Migrationsversuchs wurde die Einwanderung von PMNs bei der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation in die verschiedenen Kompartimente der Lunge (Intravasalraum, Interstitium, Alveolarraum) quantifiziert¹¹.

Organentnahme

24 Stunden nach der LPS-Inhalation wurde der Maus ein fluoreszenzmarkierter Antikörper (Gr-1) intravenös injiziert, der an PMNs bindet und folglich alle intravasalen PMNs markiert. Sechs Minuten nach der Antikörper-Injektion erfolgte die Organentnahme. Dazu wurde die Maus betäubt, das Fell abpräpariert und das Peritoneum und der Thorax eröffnet. Die Vena cava posterior wurde unterhalb der Leber durchtrennt und anschließend drei ml PBS⁻ in die rechte Herzkammer injiziert, um die Lungengefäße zu durchspülen und somit das Blut aus den Lungengefäßen zu entfernen.

Nach endotrachealer Intubation (s.o.) wurde durch wiederholte Spülung mit je einem ml PBS⁻ fünf ml einer bronchoalveolären Lavage (BAL) gewonnen. Die BAL wurde zunächst bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert. Danach wurden die vollständige Lunge und das Herz als ganzes Paket entnommen. Die einzelnen Lungenlappen wurden vom Hauptbronchus abpräpariert, anschließend zerkleinert und in eine Enzymlösung überführt. Die zerkleinerte Lunge in der Enzymlösung wurde stets im Dunkeln aufbewahrt, um das Fluorochrom des Antikörpers nicht zu beschädigen.

Die Enzymlösung, in der die zerkleinerte Lunge inkubiert wurde, hatte folgende Zusammensetzung:

- 5 ml PBS⁻
- 5 µl Hyaluronidase
- 5 µl DNase
- 5 µl Kollagenase
- 100 µl ungefärbter Gr-1-Antikörper

Um zu vermeiden, dass eventuell im Überschuss vorhandener Fluoreszenzmarkierter Antikörper an PMNs aus dem Interstitium bindet, wurden diese durch Inkubation mit dem ungefärbten Gr-1-Antikörper gebunden.

Weitere Verarbeitung der BAL und der Lungen

Die BAL wurde 10 Minuten bei 1300 Umdrehungen pro Minute (RPM) und 4°C zentrifugiert und der wässrige Überstand verworfen. Das erhaltene Produkt wurde in Färbepuffer resuspendiert, so dass ein ml einer Zellsuspension entstand. Nach Verdünnung von 10 µl der Zellsuspension in 90 µl Türkscher Lösung erfolgte die Auszählung der enthaltenen Zellen in einer Zählkammer.

Der Färbepuffer setzte sich zusammen aus 500 ml PBS⁻, 5 g BSA und 2,5 ml einer 20% NaN₃-Lösung.

Das Lungenhomogenisat wurde für 30 Minuten bei 37°C und 100 RPM auf einem Schüttelinkubator im Dunkeln in der Enzymlyse inkubiert und anschließend durch ein Zellsieb gesiebt, um die PMNs aus der Lunge freizusetzen. Das Produkt wurde 10 Minuten bei 1300 RPM und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen. Die Zellmasse wurde in fünf ml Lysepuffer resuspendiert und fünf Minuten zur Lyse der enthaltenen Erythrozyten im Dunkeln inkubiert.

Die Ausgangslösung für den Lysepuffer bestand aus 10,03 g NH₄Cl, 1,05 g NaHCO₃ und 0,465 g EDTA, die in 125 ml destilliertem Wasser aufgelöst wurden. Je Versuch wurden 0,5 ml dieser Ausgangslösung mit 4,5 ml destilliertem Wasser verdünnt und als Lysepuffer verwendet.

Anschließend wurde die Lyse durch Zugabe von 20 ml Färbepuffer unterbrochen. Nach Zentrifugation (10 min, 1300 RPM, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die erhaltenen Zellen in fünf ml Färbepuffer resuspendiert. Von dieser Resuspension wurden 10 µl in 90 µl Türkscher Lösung verdünnt und in einer Zählkammer ausgezählt.

Färbung für die Durchflusszytometrie

Die Zellsuspensionen von BAL und Lunge wurden konzentriert oder mit Färbepuffer verdünnt, so dass eine Zellkonzentration von 2 000 Zellen/µl vorlag. Zu je 100 µl der Zellsuspension wurden nach dem folgendem Schema je ein µl

der fluoreszenzmarkierten Antikörper zugegeben und 20 Minuten im Dunkeln und bei 4°C inkubiert.

| BAL | Lunge |
|-------------------------|-------------------------|
| 7/4 FITC (0,02 mg/ml) | 7/4 FITC (0,02 mg/ml) |
| CD45 PerCP (0,02 mg/ml) | CD45 PerCP (0,02 mg/ml) |
| GR-1 633 (0,05 mg/ml) | |

Für die Isotypenkontrolle wurde eine Probe mit CD45 PerCP (0,02 mg/ml), IgG2a FITC (0,02 mg/ml) und IgG2b APC (0,05 mg/ml) gefärbt.

Nach der Inkubation wurden die Proben zweimal gewaschen. Dafür wurden je zwei ml Färbepuffer zugesetzt, anschließend zentrifugiert (5 min, 1300 RPM, 4°C) und der Überstand verworfen. Die anschließende Fixierung erfolgte mit jeweils 400 µl Fixierlösung, die zu gleichen Teilen aus PFA 4% und Färbepuffer bestand.

Durchflusszytometrische Analyse

In der Durchflusszytometrie erfolgte die Analyse der Proben aus BAL und Lungenhomogenisat. Nach dem charakteristischen Verhalten der Leukozyten im Forward-/Sidewardscatter-Dotplot wurde ein Gate um die Population der Leukozyten gelegt (siehe Abbildung 2-3) und 10000 Zellen im Leukozyten-Gate gezählt.

Anschließend wurde mit dem Programm FlowJo nach Kompensation der Fluoreszenzantikörper ausgewertet, wie viele der Zellen im Leukozyten-Gate CD45 positiv waren und wie viele davon für FITC und Gr-1 positiv waren. Mit der Auswertung der Isotypenkontrolle konnten Artefakte durch unspezifische Antikörperbindungen ausgeschlossen werden.

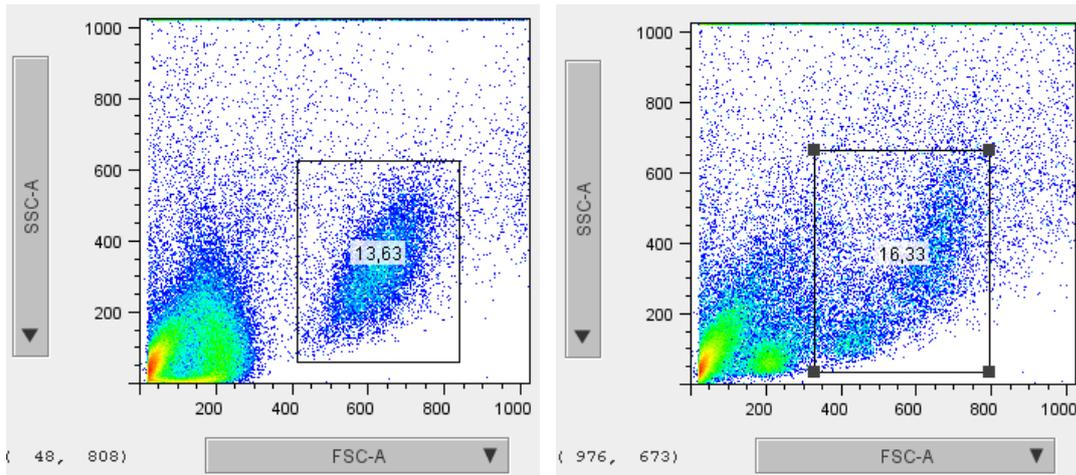


Abbildung 2-3: Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse mit FlowJo. Gate um die Leukozytenpopulation, links in einer BAL-Probe, rechts in einer Lungenprobe.

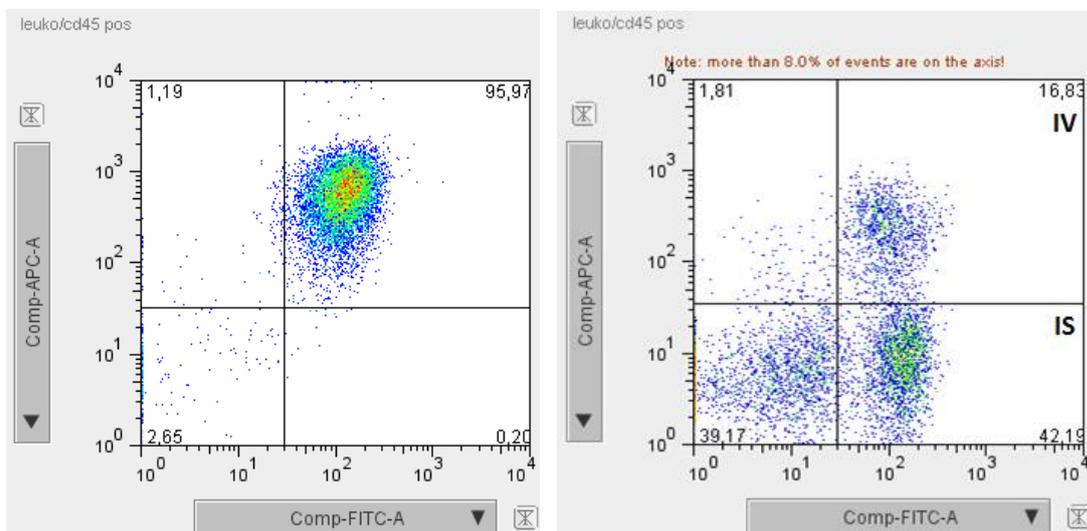


Abbildung 2-4: Auswertung der CD45-positiven Leukozyten. In der BAL (links) waren alle CD45-positiven Leukozyten für FITC und Gr-1 positiv (Population rechts oben), in der Lungenprobe konnte zwischen intravasalen PMNs (IV: FITC und Gr-1 positiv – Population rechts oben) und interstitiellen PMNs (IS: FITC positiv, Gr-1 negativ – Population rechts unten) unterschieden werden.

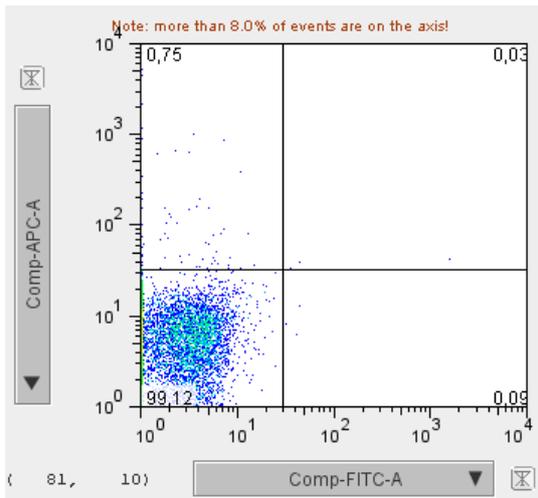


Abbildung 2-5: Darstellung der Isotypenkontrolle. Aufgrund der nahezu ausschließlich negativen Ereignisse für FITC und Gr-1 konnten Artefakte ausgeschlossen werden.

Aufgrund dieser Analyse konnte man darauf rückschließen, welche Anzahl an PMNs in welchen Lungenkompartimenten zum Zeitpunkt des Experiments vorhanden war (siehe Abbildung 2-4). Dabei galt folgendes: Die Anzahl der ausgezählten Zellen entsprach der Gesamtzahl an Leukozyten. Der Anteil an Zellen, die davon in der durchflusszytometrischen Analyse in der Auswertung des Gates um die Leukozyten für CD45 und FITC positiv waren, entsprach den PMNs. In Lungenproben entsprachen die Gr-1 positiven PMNs den PMNs, die zum Zeitpunkt des Experiments im Intravasalraum der Lunge waren und die Gr-1 negativen PMNs entsprachen den interstitiellen PMNs. In BAL-Proben waren alle PMNs für FITC und Gr-1 positiv, da bei der Färbung der BAL-Proben gefärbter Gr-1-Antikörper zugegeben wurde.

2.7. Evans blue Extravasationsversuch

Die bei der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation entstehende mikrovaskuläre Permeabilitätserhöhung wurde durch Evans blue Extravasation quantifiziert.

Für diesen Versuch wurde eine Evans blue-Lösung der Konzentration 1 mg/ml in NaCl 0,9% hergestellt. Die Lösung hatte einen pH-Wert von 7,2-7,6 und wurde für jeden Versuch frisch angesetzt.

Probengewinnung

330 Minuten nach LPS-Inhalation wurden die Mäuse gewogen und 20 mg Evans blue je kg Körpergewicht intravenös injiziert.

30 Minuten nach der Evans blue-Injektion, also sechs Stunden nach Beginn der LPS-Inhalation, begann die Probenentnahme. Nach Narkose und Fixierung wurde das Fell der Maus abpräpariert und der Thorax und das Peritoneum eröffnet. Mit einer heparinisierten Spritze wurden ca. 500 µl Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen und in einem Eppendorf-Cup auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die infrahepatische Durchtrennung der Vena cava posterior und die Infusion von 3 ml PBS⁻ in die rechte Herzkammer, um die Gefäße des Lungenkreislaufs von Blut zu befreien. Nach Entnahme des Herz-Lungen-Pakets wurden die einzelnen Lungenlappen von den Hauptbronchien abpräpariert und die erhaltenen Lungenteile gewogen. Die Lunge wurde mit 3,5 µl PBS⁻/mg Lunge versetzt und homogenisiert. Dieses Homogenisat wurde mit dem doppelten Volumen Formamid versetzt und für 12-18 Stunden bei 60°C auf einem Schüttelinkubator (30 RPM) inkubiert.

Nach Zentrifugation (13 000 RPM, 10 min, 4°C) wurde das so erhaltene Plasma abgenommen und bis zur Analyse bei 4°C aufbewahrt.

Analyse

Das Lungenhomogenisat wurde nach der Inkubation zentrifugiert (5 000 RPM, 30 Minuten, Raumtemperatur). Das 1:5 mit PBS⁻ verdünnte Blutplasma und die Überstände des Lungenhomogenisats wurden jeweils als Triplets im Photospektrometer bei 620 nm und 740 nm Wellenlänge gemessen. Um den absoluten Gehalt an Evans blue anhand der Absorptionswerte zu bestimmen,

wurde außerdem aus der Evans blue-Lösung, die für die intravenöse Injektion verwendet wurde, eine Verdünnungsreihe hergestellt und ebenfalls in Triplets bei 620 nm und 740 nm Wellenlänge gemessen.

Aus diesen Werten konnte der relative Gehalt an Evans blue in den Lungenproben in Mikrogramm Evans blue pro Gramm Lungengewebe errechnet werden.

2.8. Messung der Zytokinkonzentrationen in der BAL

In der BAL wurden mittels ELISA die Konzentrationen der Zytokine TNF α , IL-6, CXCL2/3 und CXCL1 bestimmt.

Gewinnung der BAL

Drei Stunden nach LPS-Inhalation erfolgte die BAL-Entnahme bei den Versuchstieren. Dazu wurden die Tiere betäubt, fixiert und anschließend endotracheal intubiert (s.o.). Durch wiederholte Spülung mit PBS⁻ wurden exakt zwei ml BAL gewonnen. Nach Zentrifugation der BAL (1300 RPM, 10 min., 4°C) wurde der Überstand aliquotiert und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Analyse der BAL mittels Sandwich-ELISA

Zunächst wurde eine 96well-Platte mit einem Capture-Antikörper inkubiert, der an die Platte als feste Phase bindet. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht mit 100 μ l/Well einer Lösung, in der der Capture-Antikörper in einer Konzentration von 2 μ g/ml vorhanden war. Nach Waschen mit 0,05% Tween-Waschlösung in PBS⁻ wurden freie Proteinbindungsstellen durch einstündige Inkubation mit „Reagent Diluent“ (300 μ l/well) geblockt. Diese Blockier-Lösung wurde ebenfalls wieder mit 0,05% Tween-Waschlösung abgewaschen und es erfolgte die Inkubation mit den BAL-Proben und Standards einer bekannten

Konzentration für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Dabei wurden Triplikate mit je 100 µl/well erstellt. Überschüssiges Antigen wurde mit der Waschlösung ausgewaschen und 100 µl/well biotinylierte Detektions-Antikörper dazugegeben, die an ein anderes Epitop des gesuchten Antigens binden. Nach Inkubation für zwei Stunden und einem weiteren Waschvorgang wurden diese biotinylierten Antikörper mit Streptavidin-HRP inkubiert. Überschüssiges Enzym wurde abgewaschen und die Farbreaktion durch Zugabe von Substrate-Solution, die aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin bestand, gestartet. Nach 20 Minuten Inkubation wurde die Farbreaktion durch Zugabe einer Stop-Solution beendet und die Extinktion der Proben in einer photometrischen Analyse bei 450 nm und 540 nm Wellenlänge gemessen. Aufgrund der Kopplung des Detektions-Antikörpers mit dem Enzym Meerrettichperoxidase kam es nach Zugabe des Substrates zu einem Farbumschlag, der in der photometrischen Analyse quantifiziert werden kann. Über den Vergleich mit einer Standardreihe bekannter Konzentrationen konnte auf die tatsächliche Konzentration des detektierten Antigens in der Probe rückgeschlossen werden.

2.9. Enzymaktivitätsbestimmung der Hämoxygenase-1

Probenentnahme

24 Stunden nach LPS-Inhalation wurden die Tiere betäubt, auf einer Unterlage fixiert, das Fell abpräpariert und Peritoneum und Thorax eröffnet. Die Vena cava posterior wurde infrahepatisch durchtrennt und das Herz rechts- und linksventrikulär mit HO-Aktivitätspuffer perfundiert, um die Gefäße der Lunge und der Leber von Blut zu befreien. Die Ventrikelperfusion erfolgte mit 3 ml HO-Aktivitätspuffer je Ventrikel.

500 ml des HO-Aktivitätspuffers setzten sich wie folgt zusammen:

- 32,08 ml 1M K_2HPO_4
- 7,92 ml 1M KH_2PO_4
- 7,74 ml 1M $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$

- 2,26 ml 1M NaH₂PO₄
- 10,0 ml 100mM MgCl
- 440 ml Aqua bidest.

Der HO-Aktivitätspuffer wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Das Herz-Lungen-Paket wurde als Ganzes entnommen und die einzelnen Lungenlappen abpräpariert. Außerdem wurde ein Stück der Leber (ca. 150-200 mg) entnommen. Die entnommenen Organe wurden gewogen und je Milligramm Organgewicht mit zwei µl kaltem HO-Aktivitätspuffer versetzt und auf Trockeneis gelagert. Anschließend erfolgte die Homogenisierung und Ultraschallbehandlung der Proben. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Proben zentrifugiert (18000 g, 4°C, 15 min.), der Überstand aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Für die Analyse wurde außerdem Leberzytosol gewonnen, das bei der Analyse als Quelle für die Biliverdin-Reduktase diente. Dazu wurde bei unbehandelten Mäusen, die für 12 Stunden keine Nahrung bekommen hatten, die Leber entnommen. Die entnommene Leber wurde mit vier Mikrolitern HO-Aktivitätspuffer je Milligramm Lebergewicht versetzt und homogenisiert. Das Leberhomogenisat wurde ultrazentrifugiert (105 000 g, 27 min, 4°C) und der Überstand aller Leberproben gepoolt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Die Milz wurde als Positivkontrolle entnommen, da in der Milz die HO-1 aufgrund des Erythrozytenabbaus immer exprimiert wird. Die Milzproben wurden mit zwei Mikrolitern HO-Aktivitätspuffer je Milligramm Organgewicht versetzt. Aufgrund des geringen Organgewichts wurden die Milzen von verschiedenen Tiere zusammen genommen. Die Proben wurden homogenisiert, ultraschallbehandelt und zentrifugiert (18000 g, 4°C, 15 min.). Der erhaltene Überstand wurde in Aliquots bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Analyse der Gewebeproben

Jeweils 100 µl der Gewebeproben wurden mit dem folgenden Reaktionsgemisch versetzt:

- 131 µl HO-Aktivitätspuffer
- 100 µl Leberzytosol
- 50 µl 20mM Glucose-6-Phosphat
- 4 µl Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (0,2 U/µl)
- 5 µl 80mM NADPH
- 10 µl 1mM Hämin

Außerdem wurde eine Negativprobe angefertigt, bei der kein NADPH zugegeben wurde und stattdessen das gleiche Volumen an HO-Aktivitätspuffer. Dieses Gemisch wurde eine Stunde bei 37°C im Dunkeln inkubiert, wobei eine Reaktion ablief, bei der proportional zur im Gewebe vorhandenen Menge an HO-1 Biliverdin entstand, das durch die im Leberzytosol vorhandene Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin weiterreduziert wurde. Um die Reaktion zu stoppen, wurde zu jedem Reaktionsgemisch 500 µl Chloroform zugegeben und eine Stunde auf dem Thermoschüttler inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation (15000 g, 5 min) entstanden zwei Phasen. Die obere Phase wurde verworfen, die untere Phase, die Bilirubin und Chloroform enthielt, wurde photometrisch bei 464 nm und 530 nm Wellenlänge gemessen. Indem die Extinktion von Chloroform gemessen und von den Extinktionswerten der Proben abgezogen wurde, konnte man auf die entstandene Menge an Bilirubin rückschließen. Durch Subtraktion des Wertes der Negativprobe erhielt man einen Wert, der proportional zur HO-1-Aktivität in der Gewebeprobe war. Im Vergleich mit Standardproben bekannter Aktivität konnte ein absoluter Wert für die HO-1-Aktivität im Gewebe errechnet werden.

Proteinbestimmung

Um die HO-1-Aktivität relativ pro Gewicht Protein angeben zu können, musste die Proteinkonzentration in der analysierten Gewebeprobe ermittelt werden. Die

Proteinmenge wurde dabei mit der BSA-Methode unter Verwendung des „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ entsprechend den Herstellerangaben festgestellt.

2.10. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism 5.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Zur Analyse statistischer Unterschiede wurde ein one-way ANOVA-Test durchgeführt, gefolgt von einem Bonferoni post hoc-Test. Dabei galt $p < 0,05$ als statistisch signifikant. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Differentialblutbild von Wildtyp- und HMOX flox/flox-Tieren

Es wurde ein Blutbild von beiden Mauslinien angefertigt, wo jeweils die Leukozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten im Blutausschlag gezählt wurden.

Zwischen Wildtyp-Tieren und HMOX flox/flox-Mäusen wurde kein signifikanter Unterschied in den Zellzahlen der Leukozyten, Neutrophilen und Lymphozyten festgestellt (siehe Tabelle 3-1). Unter physiologischen Bedingungen waren also keine relevanten Unterschiede im Blutbild vorhanden, aufgrund derer eine Beeinflussung der inflammatorischen Antwort zu erwarten wäre.

| | Wildtyp ($\times 10^6$) | HMOX flox/flox ($\times 10^6$) | P |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------------------|----|
| Leukozyten | 19,1 \pm 0,5 | 18,7 \pm 0,5 | NS |
| Neutrophile Granulozyten | 1,8 \pm 0,7 | 2,1 \pm 0,5 | NS |
| Lymphozyten | 16,2 \pm 1,5 | 15,7 \pm 1,0 | NS |
| Monozyten | 0,8 \pm 0,0 | 0,7 \pm 0,1 | NS |

Tabelle 3-1: Blutbild von Wildtyp-Tieren und HMOX flox/flox-Tieren⁵⁹. Es sind Mittelwerte angegeben \pm Standardabweichung, n=4 in allen Gruppen. NS=nicht signifikant.

3.2. Charakterisierung der pulmonalen Entzündungsreaktion in der Histologie mittels immunhistochemischer Darstellung von PMNs

Zur Beurteilung der pulmonalen Inflammation nach LPS-Inhalation wurden histologische Bilder erstellt. Da die PMNs eine Schlüsselrolle in der pulmonalen Inflammation darstellen, wurden diese selektiv mittels Immunhistochemie braun angefärbt.

Bei den Wildtyptieren (siehe Abbildung 3-1) zeigten sich in den Kontrollgruppen ohne LPS-Behandlung nach intraperitonealer Applikation von NaCl, Hämin oder Hämin und SnPP vereinzelt PMNs in der Histologie bei schlanken Alveolarsepten. Ohne LPS-Inhalation bestand kein Unterschied zwischen diesen Gruppen. Ebenso waren bei den HMOX flox/flox-Mäusen (siehe Abbildung 3-2) ohne pulmonale Inflammation keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (NaCl, Hämin oder Hämin+SnPP) zu sehen.

Nach LPS-Inhalation wurde bei den Wildtyptieren im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS eine deutlich erhöhte Anzahl an PMNs und verdickte Alveolarsepten als Zeichen eines interstitiellen Lungenödems sichtbar. Die Vorbehandlung mit Hämin führte nach LPS-Inhalation gegenüber der Kontrolle mit LPS zu einer geringeren Anzahl an PMNs in der Lungenhistologie und die Alveolarsepten waren kaum ödematös verändert, was auf die starke anti-inflammatorische Wirkung der HO-1 schließen lässt. Bei Inhibition der HO-1 kam es nach LPS-Inhalation zu einer stark erhöhten Anzahl an PMNs in der Lunge und die Alveolarsepten waren stärker verdickt als in der Kontrollgruppe.

Bei den HMOX flox/flox-Mäusen, bei denen die myeloide HO-1 nicht exprimiert wird, zeigte sich ebenfalls nach LPS-Inhalation im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation eine deutlich erhöhte Anzahl an PMNs und ein ödematöser Aspekt der Alveolarsepten. Überraschenderweise wurde auch in den HMOX flox/flox-Mäusen nach HO-1-Induktion ein starker anti-inflammatorischer Effekt sichtbar. So waren bei Vorbehandlung der Mäuse mit Hämin nach LPS-Inhalation gegenüber der Kontrollgruppe weniger PMNs im Lungengewebe vorhanden und

die Alveolarsepten waren kaum verdickt. Bei HO-1-Inhibition zeigten sich nach Auslösung der pulmonalen Inflammation sehr viele PMNs und stark aufgequollene Alveolarsepten und damit eine stärker entzündlich veränderte Histologie als das der Kontrollgruppe.

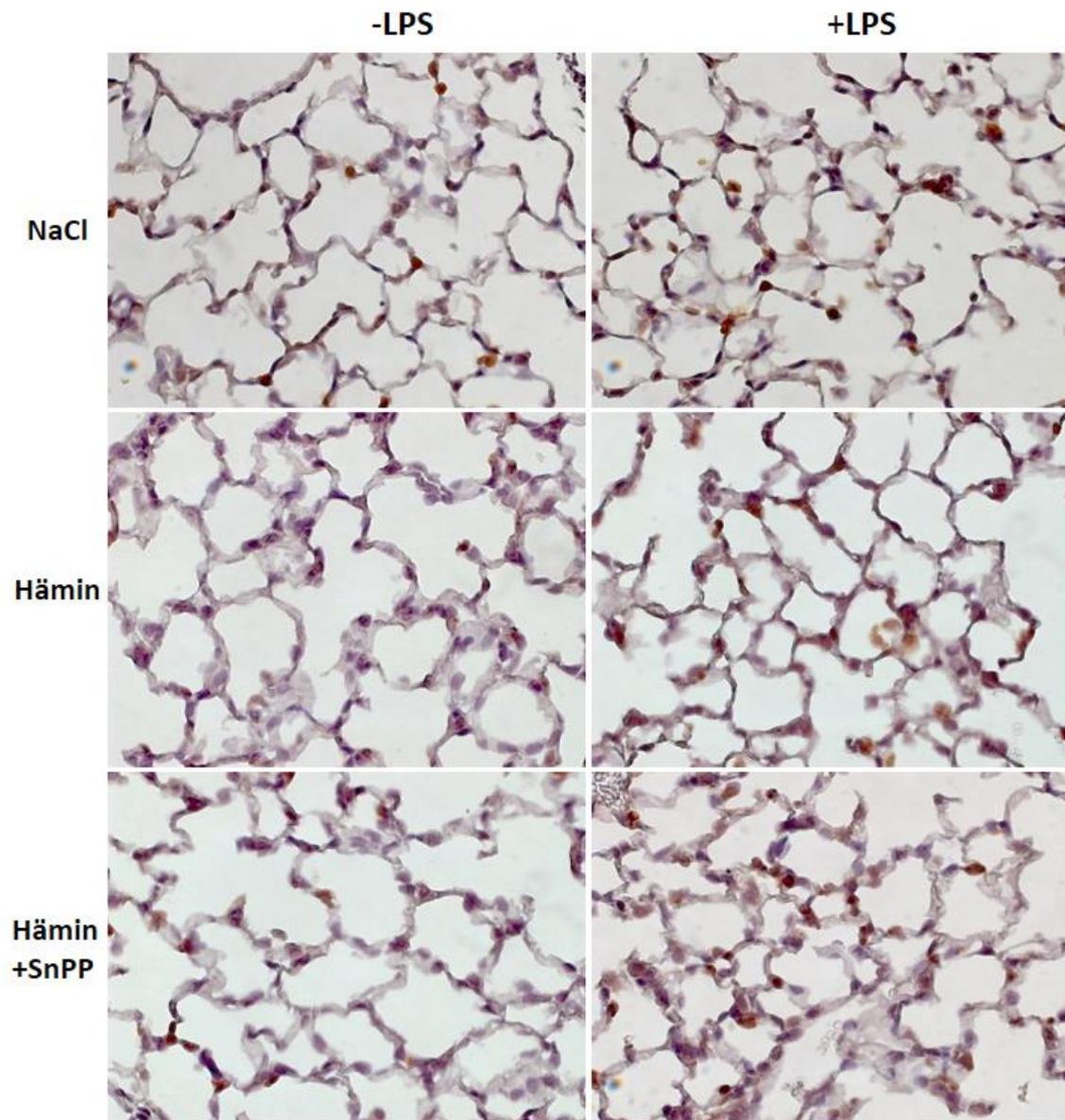


Abbildung 3-1: Lungenhistologie mit immunhistochemischer Anfärbung von PMNs (braun)⁵⁹. Von oben nach unten: Kontrollgruppe (NaCl), HO-1-Induktion (Hämin), HO-1-Inhibition (Hämin+SnPP). Wildtyptiere, 64x Vergrößerung, n=2

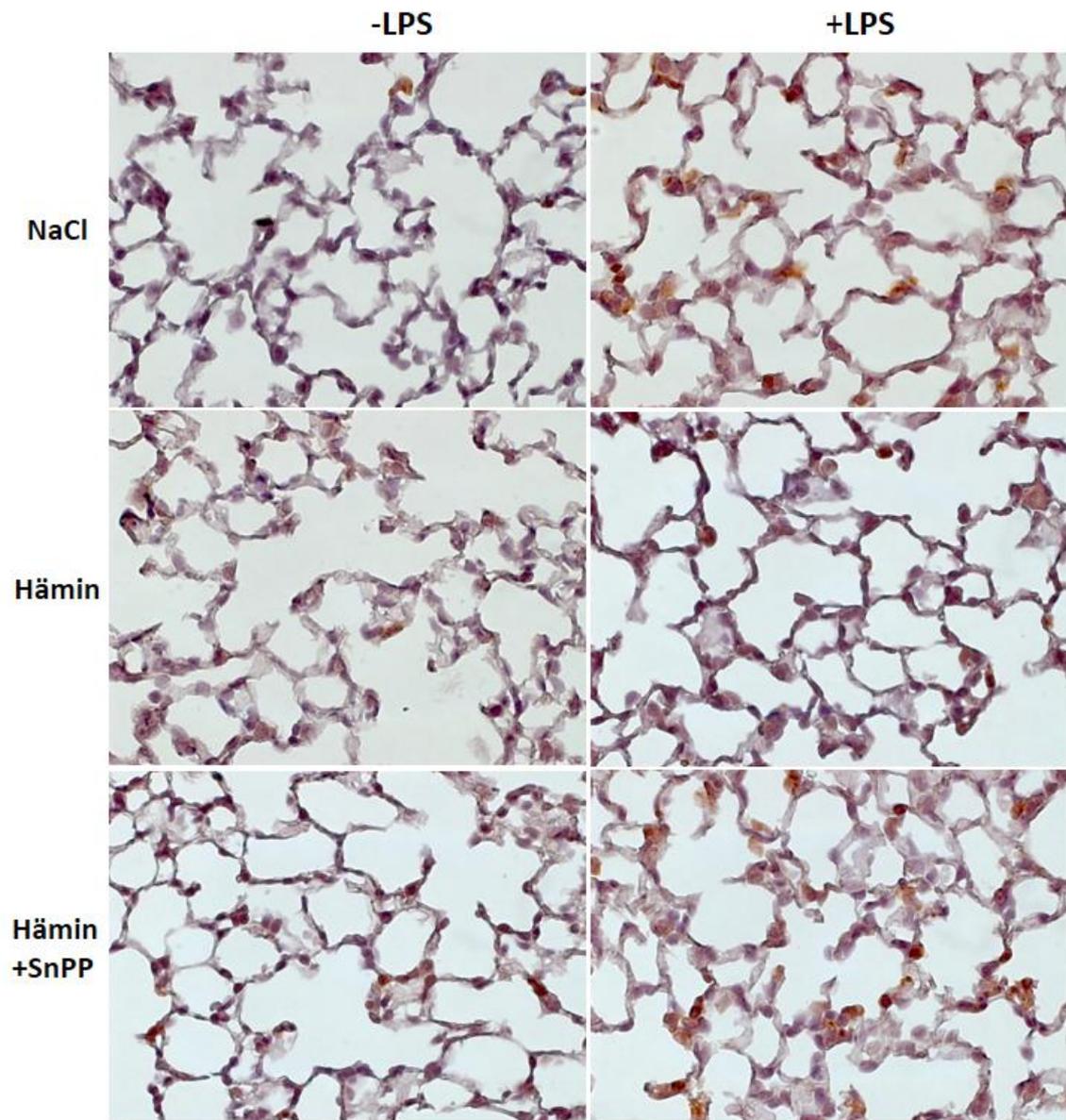


Abbildung 3-2: Lungenhistologie mit immunhistochemischer Anfärbung von PMNs (braun)⁵⁹. Von oben nach unten: Kontrollgruppe (NaCl), HO-1-Induktion (Hämin), HO-1-Inhibition (Hämin+SnPP). HMOX flox/flox-Mäuse, 64x Vergrößerung, n=2

3.3. Darstellung der Hämoxxygenase-1-Expression mittels Immunfluoreszenzfärbung

Die HO-1-Expression wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung in der Lungenhistologie dargestellt (siehe Abbildung 3-3).

In den Kontrollgruppen ohne LPS-Inhalation wurde sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei den HMOX flox/flox-Mäusen die HO-1 kaum dargestellt. Dabei konnte kein Unterschied zwischen beiden Mauslinien festgestellt werden.

Bei den Wildtyp-Tieren wurde in der Kontrollgruppe nach LPS-Inhalation eine deutliche Zunahme der HO-1 sowohl im Lungengewebe als auch in den Alveolarmakrophagen beobachtet. Die Hämin-Vorbehandlung führte erwartungsgemäß nochmals zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS-Inhalation deutlich verstärkten Darstellung der HO-1. Es fiel auf, dass die HO-1 in Alveolarmakrophagen besonders stark sichtbar war.

In den HMOX flox/flox-Mäusen wurde die HO-1 in myeloiden Zellen nicht exprimiert. Das wurde auch in der Immunfluoreszenz-Darstellung sichtbar, bei der in den Alveolarmakrophagen in der Lungenhistologie die HO-1 nicht anfärbbar war. Im Lungengewebe konnte die HO-1 dargestellt werden, wobei Häminvorbehandlung ebenfalls zu einer Erhöhung der HO-1 führte. In den HMOX flox/flox-Mäusen konnte im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren keine stärkerer immunhistochemischer Nachweis der HO-1- im Lungengewebe während der pulmonalen Inflammation festgestellt werden, was gegen die Annahme einer kompensatorischen Erhöhung der nicht-myeloiden HO-1 in den HMOX flox/flox-Tieren spricht.

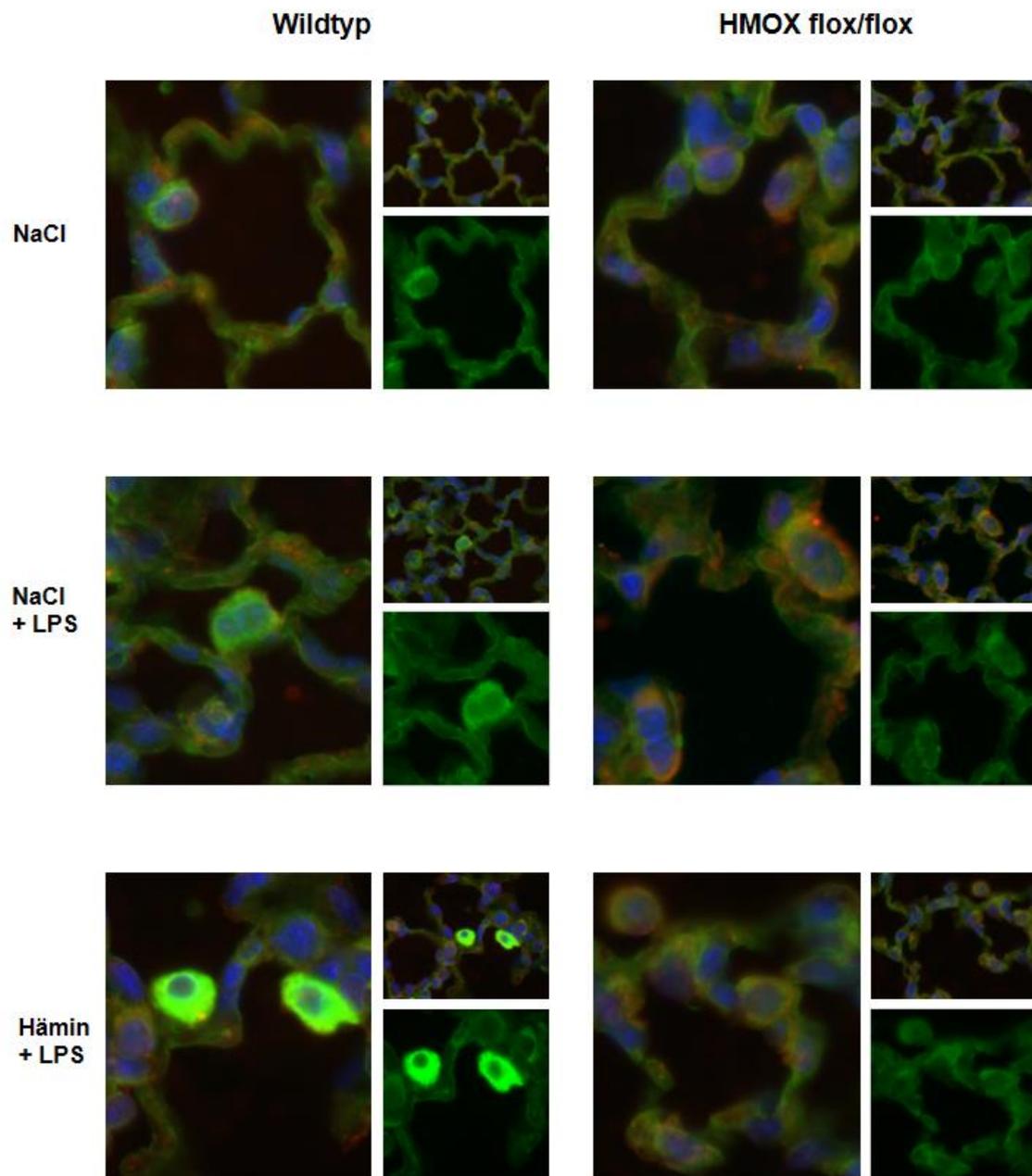


Abbildung 3-3: Lungenhistologie mit Darstellung der HO-1 mittels Immunfluoreszenz⁵⁹. Die HO-1 wurde grün, das Zytoskelett rot und die Zellkerne blau angefärbt. In der linken Spalte sind Wildtyptiere und in der rechten Spalte HMOX flox/flox-Mäuse abgebildet. Das große Bild zeigt einen Ausschnitt der Gesamtübersicht, die in dem kleinen Bild rechts oben dargestellt ist. In dem kleinen Bild jeweils rechts unten ist nur das grüne Immunfluoreszenz-Signal durch die HO-1 zu sehen. Vergrößerung 64x, n=2

3.4. Quantifizierung der PMN-Migration in die verschiedenen Kompartimente der Lunge

Um die Einwanderung von PMNs in die Lunge zu quantifizieren und zwischen den verschiedenen Lungenkompartimenten differenzieren zu können, wurde im *in vivo*-Migrationsversuch die Anzahl an PMNs in den einzelnen Lungenkompartimenten mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

In den verschiedenen Gruppen ohne LPS-Inhalation konnte bei HO-1-Induktion bzw. HO-1-Inhibition sowohl bei den Wildtyptieren (siehe Abbildung 3-4), als auch bei den HMOX flox/flox-Mäusen (siehe Abbildung 3-5) kein signifikanter Unterschied bei der Anzahl der PMNs in den verschiedenen Lungenkompartimenten festgestellt werden.

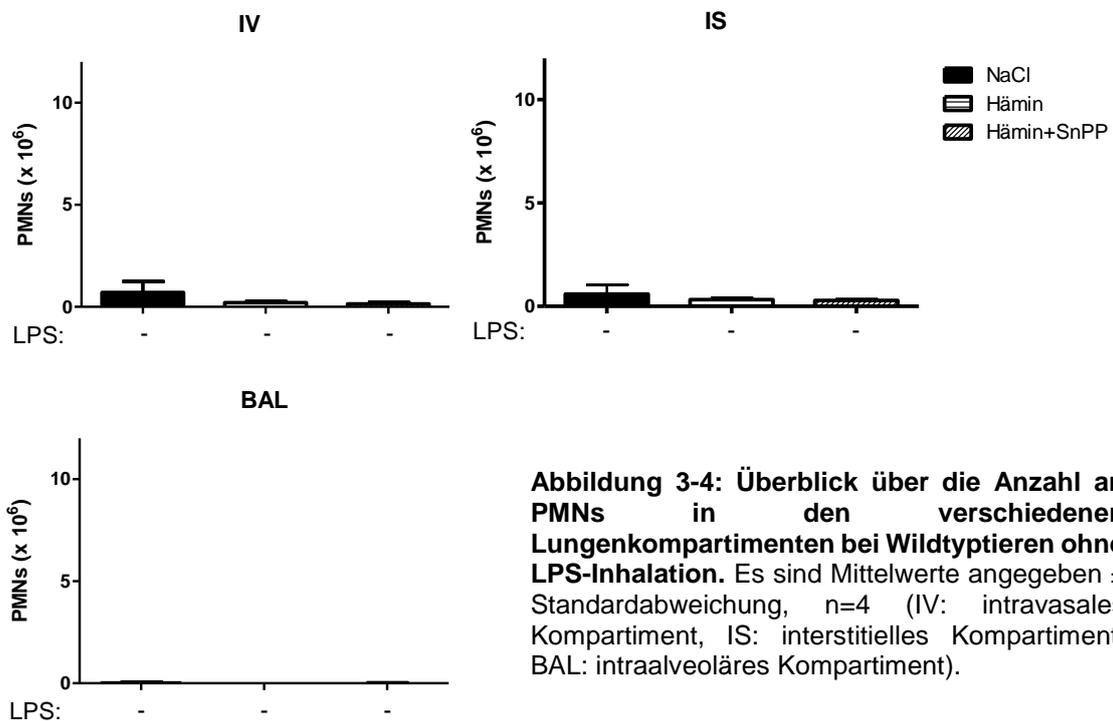
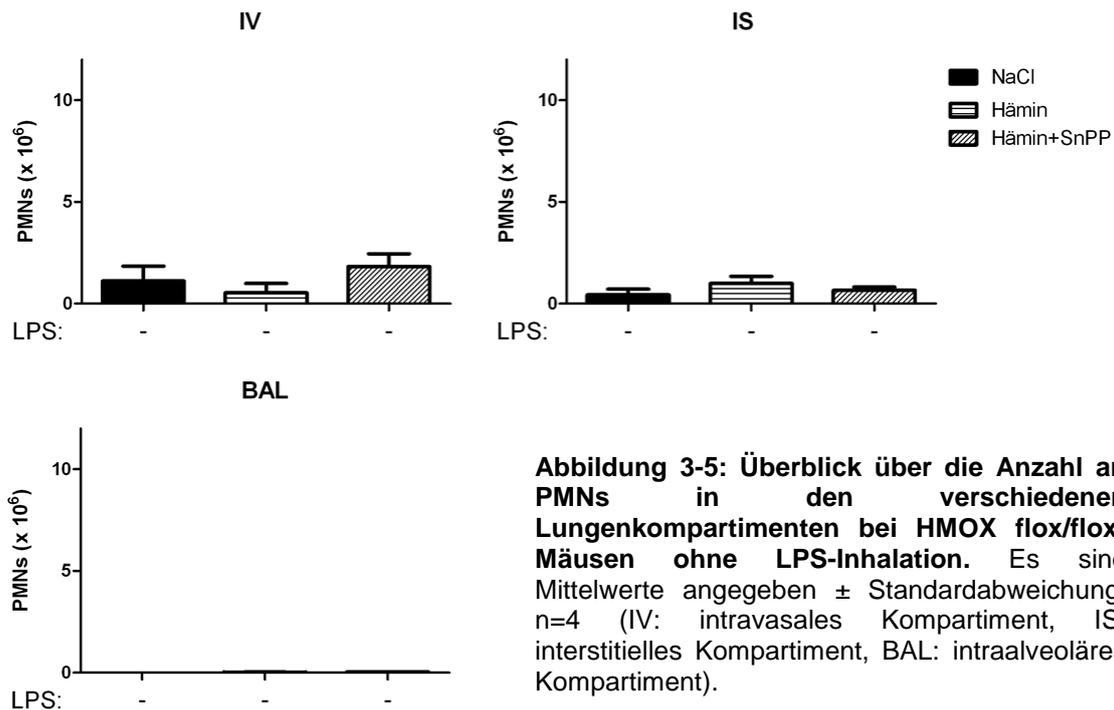


Abbildung 3-4: Überblick über die Anzahl an PMNs in den verschiedenen Lungenkompartimenten bei Wildtyptieren ohne LPS-Inhalation. Es sind Mittelwerte angegeben \pm Standardabweichung, n=4 (IV: intravasales Kompartiment, IS: interstitielles Kompartiment, BAL: intraalveoläres Kompartiment).



Bei den Wildtyptieren wurden nach LPS-Inhalation eine höhere Anzahl an PMNs in allen Lungenkompartimenten gemessen (siehe Abbildung 3-6) (Intravasalraum: Kontrollgruppe ohne LPS: $0,71 \pm 0,54 \cdot 10^6$ vs. Kontrollgruppe mit LPS: $3,15 \pm 1,12 \cdot 10^6$; Interstitium: Kontrollgruppe ohne LPS: $0,60 \pm 0,44 \cdot 10^6$ vs. Kontrollgruppe mit LPS: $5,14 \pm 1,80 \cdot 10^6$; Alveolarraum: Kontrollgruppe ohne LPS: $0,04 \pm 0,04 \cdot 10^6$ vs. Kontrollgruppe mit LPS: $1,90 \cdot 10^6 \pm 0,50$; $P < 0,05$).

Die anti-inflammatorische Wirkung der HO-1-Induktion führte bei den Wildtyptieren zu gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindertem PMN-Einstrom in alle Lungenkompartimente (Intravasalraum: Hämin+LPS: $1,86 \pm 0,95 \cdot 10^6$; Interstitium: Hämin+LPS: $3,47 \pm 0,98 \cdot 10^6$; Alveolarraum: Hämin+LPS: $1,31 \pm 0,38 \cdot 10^6$; $P < 0,05$).

Dagegen erhöhte die Inhibition der HO-1 die PMNs in allen Lungenkompartimenten signifikant (Intravasalraum: Hämin/SnPP+LPS: $4,55 \pm 0,82 \cdot 10^6$; Interstitium: Hämin/SnPP+LPS: $8,58 \pm 2,90 \cdot 10^6$; Alveolarraum: Hämin/SnPP+LPS: $2,83 \pm 0,85 \cdot 10^6$; $P < 0,05$).

Die LPS-Inhalation führte bei den HMOX flox/flox-Mäusen ebenfalls zur Erhöhung der PMNs in allen Lungenkompartimenten (siehe Abbildung 3-7) (Intravasalraum: Kontrollgruppe ohne LPS: $1,11 \pm 0,73 \cdot 10^6$ vs. Kontrollgruppe mit LPS: $3,05 \pm 1,16 \cdot 10^6$; Interstitium: Kontrollgruppe ohne LPS: $0,43 \pm 0,28 \cdot 10^6$ vs. Kontrollgruppe mit LPS: $5,43 \pm 1,38 \cdot 10^6$; Alveolarraum: Kontrollgruppe ohne LPS: $0,01 \pm 0,00 \cdot 10^6$ vs. Kontrollgruppe mit LPS: $2,28 \pm 0,24 \cdot 10^6$; $P < 0,05$).

Dabei konnte auch bei den HMOX flox/flox-Mäusen durch HO-1-Induktion eine signifikante Reduktion der Anzahl an PMNs im Lungeninterstitium und im Alveolarraum erreicht werden (Interstitium: Hämin+LPS: $2,77 \pm 0,55 \cdot 10^6$; Alveolarraum: Hämin+LPS: $1,32 \pm 0,25 \cdot 10^6$; $P < 0,05$). Dieses Ergebnis bestätigte und quantifizierte die Ergebnisse der Immunhistologie.

Nach Hämin und SnPP-Applikation waren aufgrund der HO-1-Inhibition in allen Lungenkompartimenten signifikant mehr PMNs vorhanden (Intravasalraum: Hämin/SnPP+LPS: $5,98 \pm 0,73 \cdot 10^6$; Interstitium: Hämin/SnPP+LPS: $7,40 \pm 2,58 \cdot 10^6$; Alveolarraum: Hämin/SnPP+LPS: $3,20 \pm 0,76 \cdot 10^6$; $P < 0,05$).

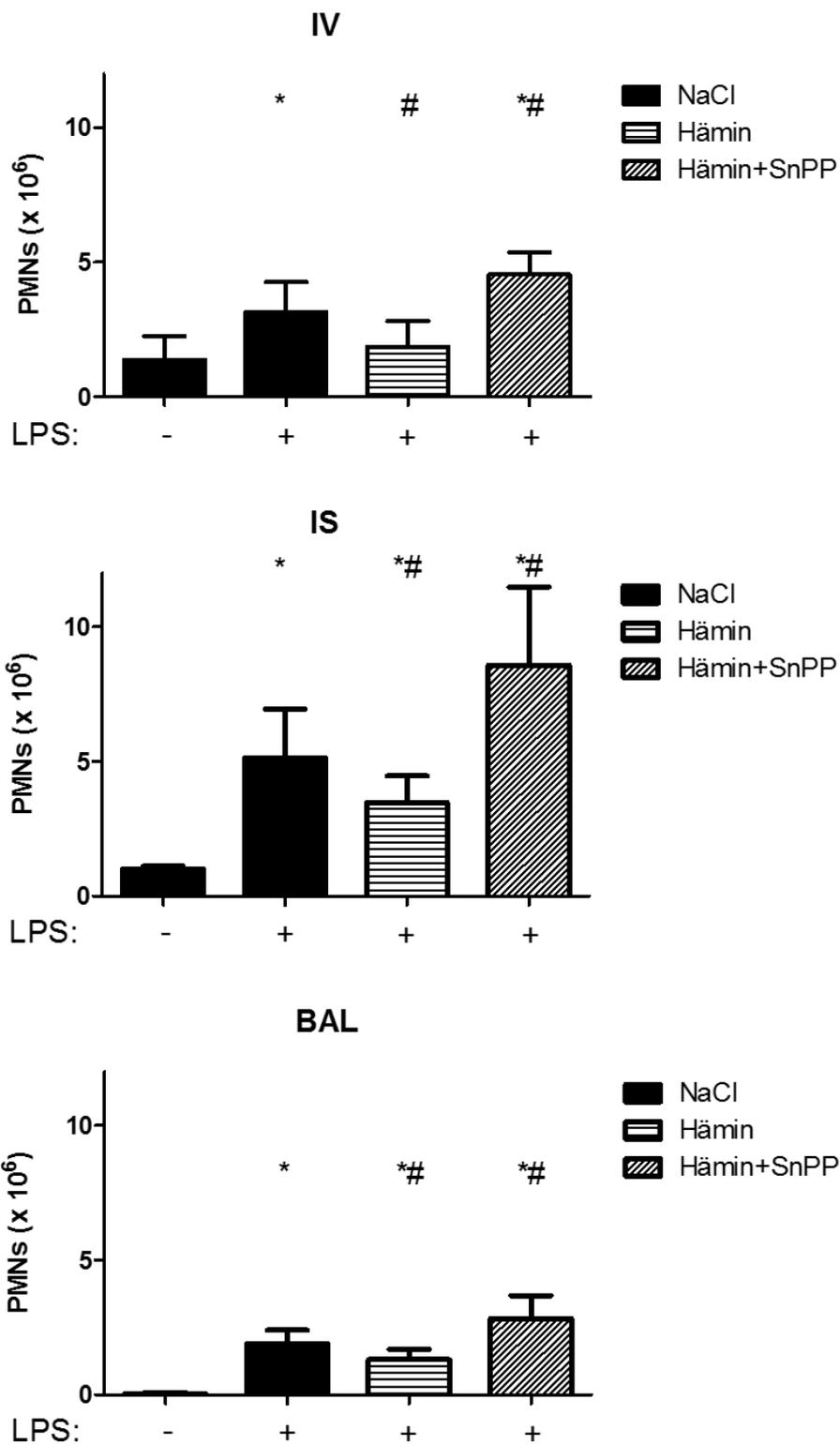


Abbildung 3-6: Anzahl an PMNs in den verschiedenen Lungenkompartimenten bei Wildtyptieren⁵⁹. IV: Intravasalraum, IS: Interstitium, BAL: Alveolarraum. Es sind Mittelwerte angegeben \pm Standardabweichung, $n=4$ in der Kontrollgruppe ohne LPS, $n \geq 5$ in den Gruppen mit LPS. * $p < 0,05$ zur Kontrolle ohne LPS; # $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe mit LPS.

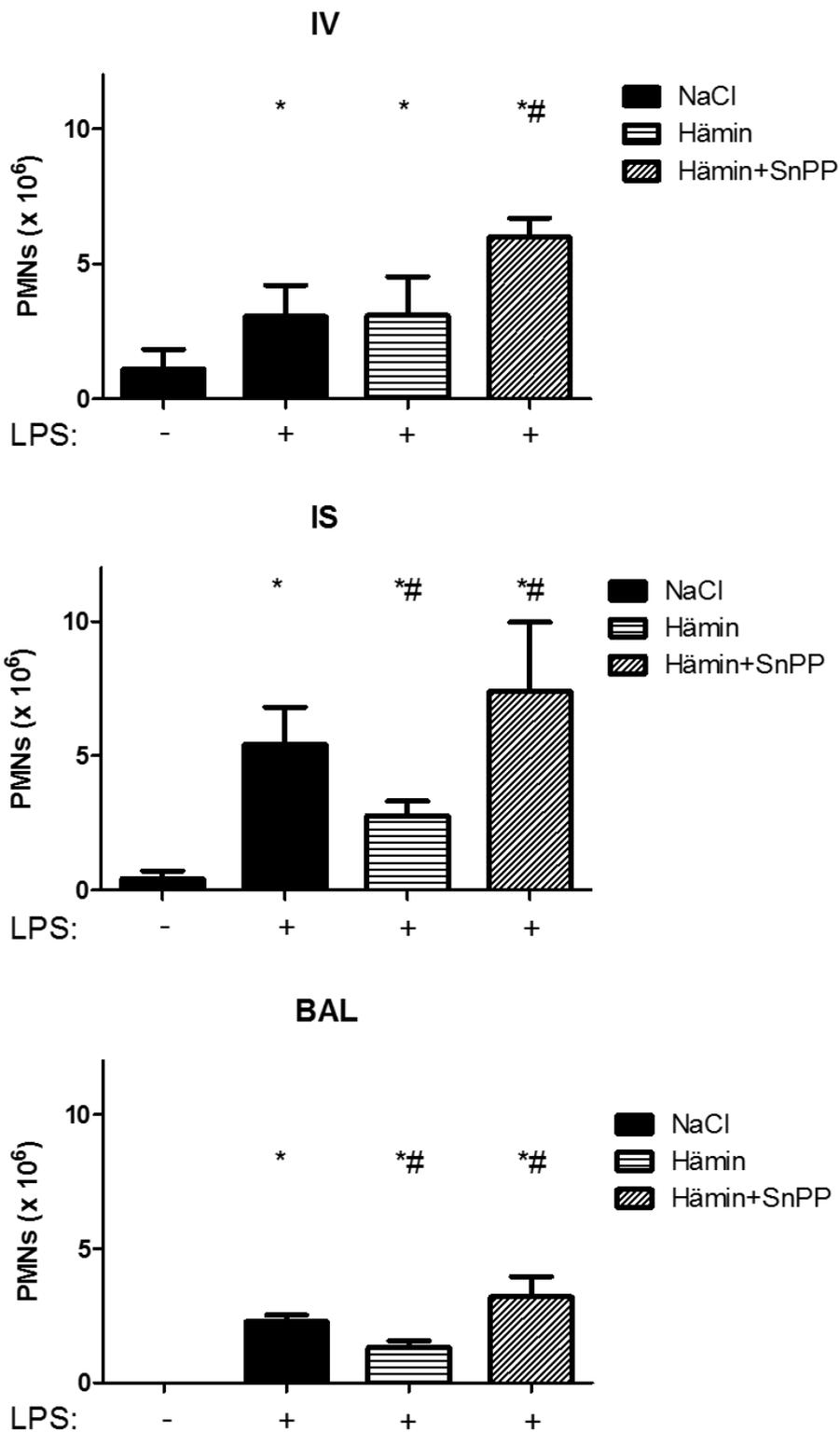


Abbildung 3-7: Anzahl an PMNs in den verschiedenen Lungenkompartimenten bei HMOX flox/flox-Mäusen⁵⁹. IV: Intravasalraum, IS: Interstitium, BAL: Alveolarraum. Es sind Mittelwerte angegeben \pm Standardabweichung, n=4 in der Kontrollgruppe ohne LPS, n=7 in den Gruppen mit LPS. * p<0,05 zur Kontrolle ohne LPS; # p<0,05 zur Kontrollgruppe mit LPS.

3.5. Mikrovaskuläre Permeabilität

Um auf das Ausmaß des Kapillarlecks rückschließen zu können, wurde mittels Evans blue Extravasation die mikrovaskuläre Permeabilität quantifiziert (siehe Abbildungen 3-8 und 3-9).

Bei beiden Mauslinien zeigte sich durch die alleinige Behandlung mit Hämin oder Hämin und SnPP ohne LPS-Inhalation keine signifikante Veränderung der mikrovaskulären Permeabilität im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe.

Bei den Wildtyptieren wurde in der Kontrollgruppe nach LPS-Inhalation eine signifikante Erhöhung der Gefäßpermeabilität beobachtet (Kontrollgruppe ohne LPS: $94,0 \pm 19,1 \mu\text{g/g}$ vs. Kontrollgruppe mit LPS: $207,5 \pm 34,9 \mu\text{g/g}$; $P < 0,05$). Die Induktion der HO-1 führte zu einem deutlich geringeren Kapillarleck (Hämin+LPS: $76,4 \pm 24,6 \mu\text{g/g}$; $P < 0,05$). Dabei bestand kein signifikanter Unterschied von der Hämin-Gruppe mit LPS zur Kontrollgruppe ohne LPS-Induktion. Im Gegensatz dazu zeigten sich nach HO-1-Inhibition gegenüber der Kontrollgruppe mit LPS-Induktion signifikant erhöhte Evans blue-Konzentrationen im Lungengewebe (Hämin/SnPP+LPS: $280,3 \pm 43,1 \mu\text{g/g}$; $P < 0,05$).

In der Gruppe der HMOX flox/flox-Mäuse kam es ebenfalls nach LPS-Inhalation zu einer signifikanten Erhöhung der Evans blue Extravasation (Kontrollgruppe ohne LPS: $94,7 \pm 40,5 \mu\text{g/g}$ vs. Kontrollgruppe mit LPS: $177,9 \pm 19,9 \mu\text{g/g}$; $P < 0,05$). Die Stimulation der HO-1 führte auch bei Abwesenheit der myeloiden HO-1 zu einer Stabilisierung der endothelialen Barriere (Hämin+LPS: $109,7 \pm 14,8 \mu\text{g/g}$; $P < 0,05$), wobei ebenso kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation bestand. Damit wurde die wichtige anti-inflammatorische Rolle der nicht-myeloiden HO-1 in Bezug auf die mikrovaskuläre Permeabilität unterstrichen. Nach HO-1-Inhibition kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe mit LPS-Induktion zu einem signifikant erhöhten Austritt von Evans blue in das Lungengewebe (Hämin/SnPP+LPS: $233,8 \pm 18,8 \mu\text{g/g}$; $P < 0,05$).

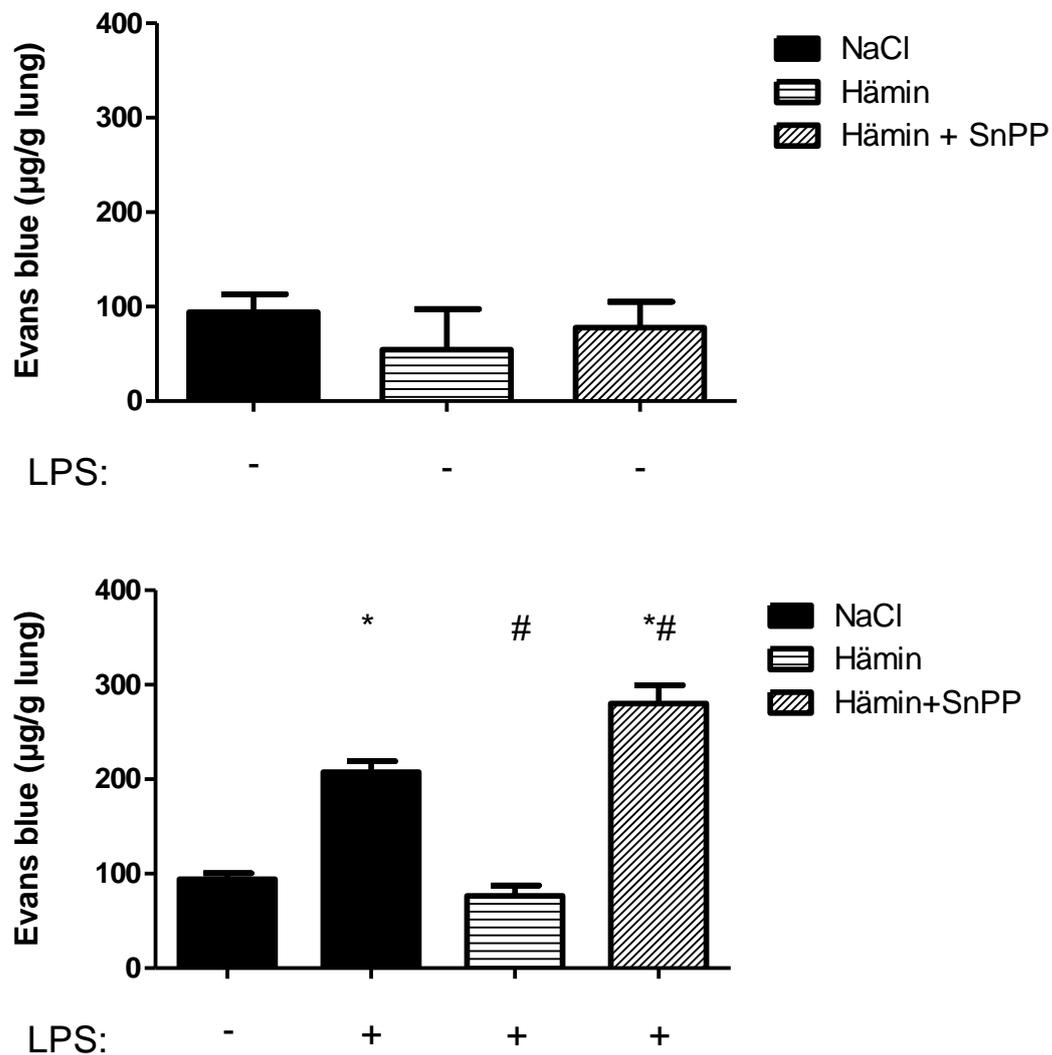


Abbildung 3-8: Messung der Evans blue Extravasation bei Wildtypmäusen⁵⁹. Es sind Mittelwerte angegeben \pm Standardabweichung, $n \geq 5$ in den Gruppen mit LPS, $n \geq 3$ in der Kontrollgruppe ohne LPS. * $P < 0,05$ zur Kontrollgruppe ohne LPS; # $P < 0,05$ zur Kontrollgruppe mit LPS

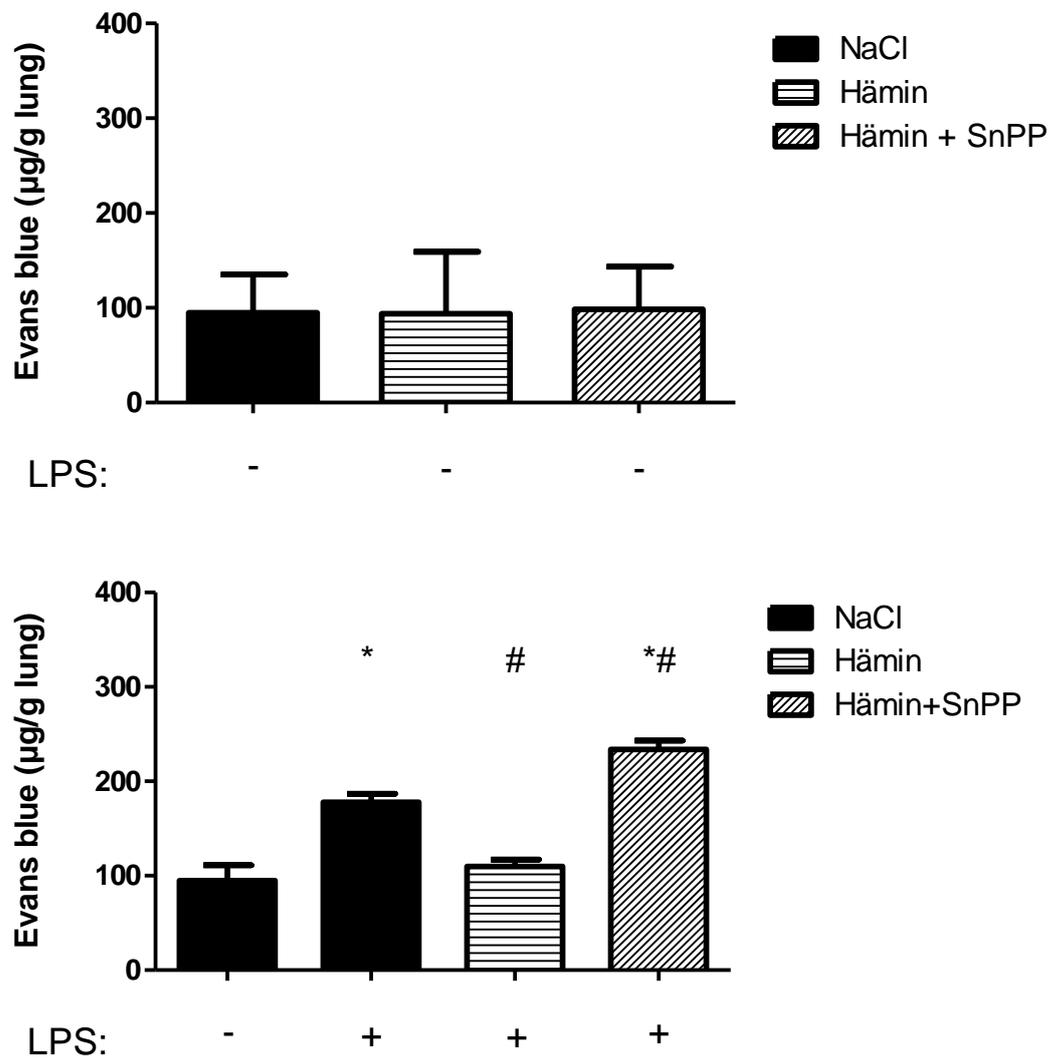


Abbildung 3-9: Messung der Evans blue Extravasation bei HMOX flox/flox-Mäusen⁵⁹. Es sind Mittelwerte angegeben \pm Standardabweichung, $n \geq 4$ in allen Gruppen. * $P < 0,05$ zur Kontrollgruppe ohne LPS; # $P < 0,05$ zur Kontrollgruppe mit LPS

3.6. Messung der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in der BAL

In der BAL wurden die Konzentrationen von CXCL2/3 (MIP-2), TNF- α , IL-6 und CXCL1 (KC) bei Wildtyptieren und bei HMOX flox/flox-Mäusen gemessen (siehe Abbildung 3-10 und 3-11).

Sowohl bei den Wildtyptieren als auch bei den HMOX flox/flox-Mäusen führte die alleinige Behandlung mit Hämin oder mit Hämin und SnPP ohne anschließende LPS-Inhalation zu keiner signifikanten Veränderung der bronchoalveolären Konzentrationen der gemessenen Zytokine und Chemokine.

Drei Stunden nach der LPS-Gabe zeigten sich bei beiden Mauslinien in allen Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation signifikant erhöhte Zytokinkonzentrationen ($P < 0,05$). Die Induktion der HO-1 führte bei den Wildtyptieren gegenüber der Kontrollgruppe zu signifikant niedrigeren Konzentrationen von TNF- α , IL-6, CXCL1 und CXCL2/3 (Hämin+LPS: TNF- α : 1059 ± 326 pg/ml, IL-6: 339 ± 181 pg/ml, CXCL1: 3149 ± 613 pg/ml, CXCL2/3: 1262 ± 179 pg/ml vs. Kontrollgruppe mit LPS: TNF- α : 1564 ± 275 pg/ml, IL-6: 638 ± 116 pg/ml, CXCL1: 3757 ± 820 pg/ml, CXCL2/3: 1904 ± 216 pg/ml; $P < 0,05$). Demgegenüber führte die Inhibition der HO-1 zu einer weiteren signifikanten Erhöhung von CXCL1 (Hämin/SnPP+LPS: 4857 ± 425 pg/ml; $P < 0,05$), während sich die Werte von TNF- α , IL-6 und CXCL2/3 nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe unterschieden.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen des *in vivo*-Transmigrationsversuchs waren die Konzentrationen aller gemessenen Zytokine und Chemokine nach HO-1-Induktion auch bei den HMOX flox/flox-Mäusen signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (Hämin+LPS: TNF- α : 1444 ± 342 pg/ml, IL-6: 441 ± 125 pg/ml, CXCL1: 1672 ± 179 pg/ml, CXCL2/3: 1205 ± 465 pg/ml vs. Kontrollgruppe mit LPS: TNF- α : 2382 ± 325 pg/ml, IL-6: 680 ± 87 pg/ml, CXCL1: 2447 ± 71 pg/ml, CXCL2/3: 1819 ± 531 pg/ml; $P < 0,05$). Die Inhibition der HO-1 führte wie bei den Wildtyptieren zur signifikanten Erhöhung von CXCL1 (Hämin/SnPP+LPS: $2943 \pm$

137 pg/ml; $P < 0,05$), während bei den anderen Zytokinen und Chemokinen keine signifikante Änderung festgestellt wurde.

Beim Vergleich zwischen Wildtypgruppe und HMOX flox/flox-Mäusen fiel auf, dass die Konzentrationen von TNF- α bei den HMOX flox/flox-Mäusen gegenüber den Wildtyptieren deutlich erhöht waren, während bei Wildtyptieren höhere CXCL1-Konzentrationen festgestellt wurden. Dabei blieb die relative Änderung der jeweiligen Konzentrationen bei HO-1-Induktion bei beiden Mauslinien gleich. Bei den BAL-Konzentrationen von IL-6 und CXCL2/3 gab es zwischen Wildtyp- und HMOX flox/flox-Mäusen im Vergleich der entsprechenden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

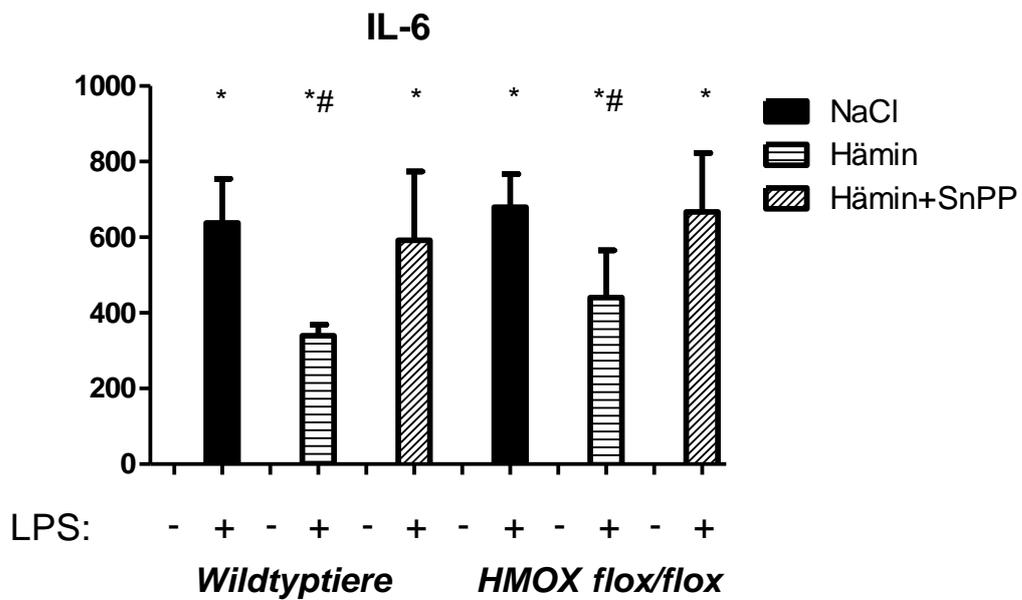
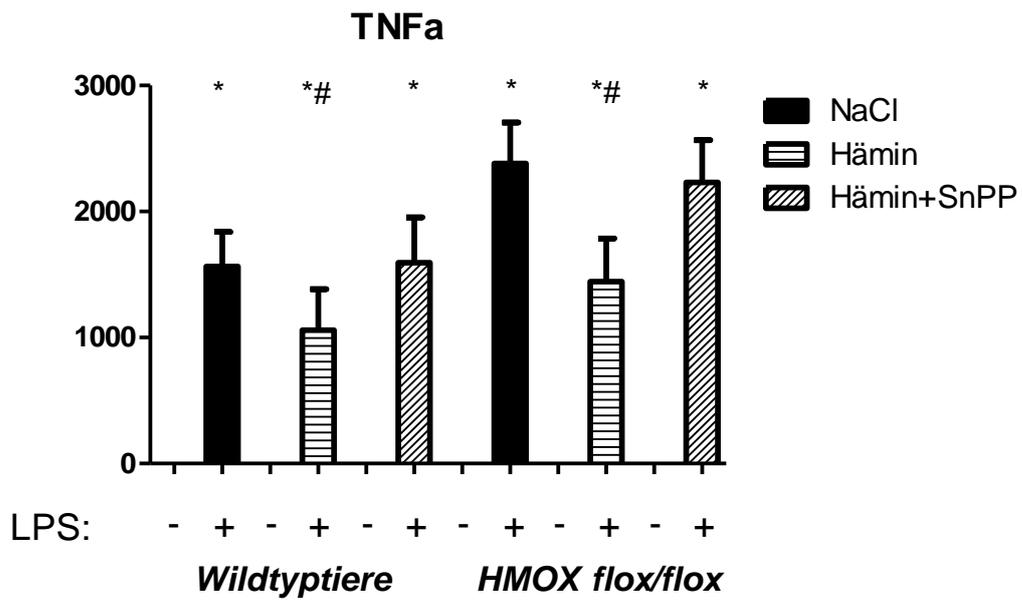


Abbildung 3-10: Messung der Konzentrationen von TNF- α und IL-6 in der BAL⁵⁹. Es sind Mittelwerte angegeben \pm Standardabweichung, $n \geq 5$ in allen Gruppen. * $P < 0,05$ zur Kontrollgruppe ohne LPS; # $P < 0,05$ zur Kontrollgruppe mit LPS.

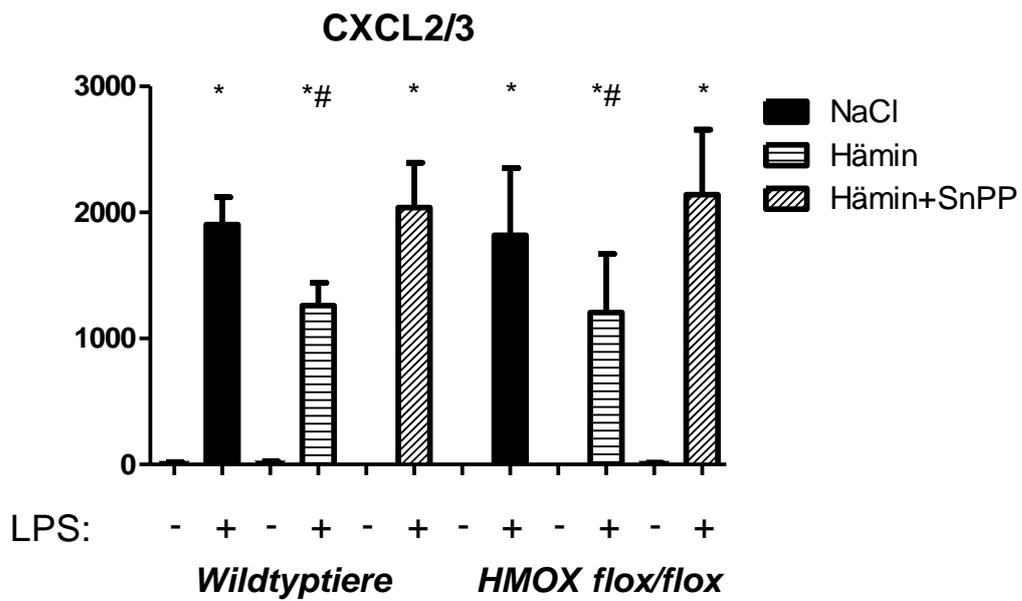
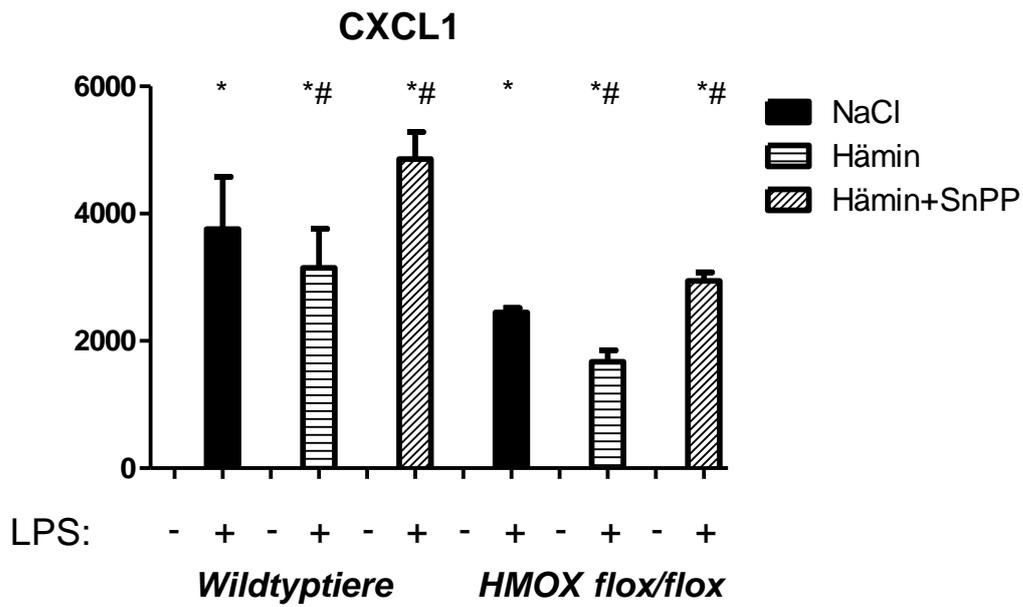


Abbildung 3-11: Messung der Konzentrationen von CXCL1 und CXCL2/3 in der BAL⁵⁹. Es sind Mittelwerte angegeben \pm Standardabweichung, $n \geq 5$ in allen Gruppen. * $P < 0,05$ zur Kontrollgruppe ohne LPS; # $P < 0,05$ zur Kontrollgruppe mit LPS.

3.7. Enzymaktivitätsbestimmung der Hämoxxygenase-1

Es wurde die Aktivität der HO-1 im Lungengewebe von Wildtyptieren der Linie C57/BL6 und von HMOX flox/flox-Mäusen bestimmt (siehe Abbildungen 3-12 und 3-13).

Die alleinige Behandlung der Mäuse mit Hämin ohne anschließende LPS-Inhalation führte weder bei den Wildtypmäusen noch bei den HMOX flox/flox-Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung der HO-1-Aktivität im Lungengewebe gegenüber der Kontrollgruppe ohne LPS-Inhalation. Jedoch konnte bereits ohne LPS-Gabe ein inhibitorischer Effekt der Applikation von Hämin und SnPP auf die HO-1-Aktivität festgestellt werden (Wildtyptiere: Hämin/SnPP: $7,2 \pm 8,4$ pmol/mg/h vs. Kontrollgruppe ohne LPS: $103,8 \pm 13,0$ pmol/mg/h; HMOX flox/flox: Hämin/SnPP: $2,8 \pm 5,5$ pmol/mg/h vs. Kontrollgruppe ohne LPS: $74,5 \pm 44,2$ pmol/mg/h; $P < 0,05$).

Bei den Wildtyptieren führte die Induktion einer pulmonalen Inflammation durch LPS-Inhalation zu signifikant erhöhten HO-1-Aktivitätswerten im Lungengewebe (Kontrollgruppe ohne LPS: $103,8 \pm 13,0$ pmol/mg/h vs. Kontrollgruppe mit LPS: $151,6 \pm 21,2$ pmol/mg/h; $P < 0,05$). Die pharmakologische Stimulation der HO-1 durch Hämin-Applikation steigerte die HO-1-Aktivität weiter (Hämin+LPS: $186,3 \pm 22,7$ pmol/mg/h; $P < 0,05$), während die Inhibition der HO-1 die Aktivität stark senkte (Hämin/SnPP+LPS: $93,4 \pm 10,6$ pmol/mg/h; $P < 0,05$).

Die LPS-Inhalation führte auch bei den HMOX flox/flox-Tieren zur signifikanten Erhöhung der HO-1-Aktivität (Kontrollgruppe ohne LPS: $74,5 \pm 44,15$ pmol/mg/h vs. Kontrollgruppe mit LPS: $147,3 \pm 12,7$ pmol/mg/h; $P < 0,05$). Wie bei den Wildtyptieren konnte durch Hämin-Behandlung die HO-1-Aktivität im Lungengewebe gesteigert werden (Hämin+LPS: $191,7 \pm 40,4$ pmol/mg/h; $P < 0,05$), während die Gabe von Hämin und SnPP zu einer signifikanten Verminderung der HO-1-Aktivität führte (Hämin/SnPP+LPS: $56,5 \pm 16,0$ pmol/mg/h; $P < 0,05$).

Im Vergleich beider Mauslinien zeigte sich kein Unterschied der HO-1-Aktivität in der Lunge. Die Abwesenheit der myeloiden HO-1 bei den HMOX flox/flox-Mäusen führte dementsprechend nicht zu einer kompensatorischen Erhöhung der HO-1-Aktivität im Lungengewebe, übereinstimmend mit den zuvor beschriebenen Immunfluoreszenzaufnahmen.

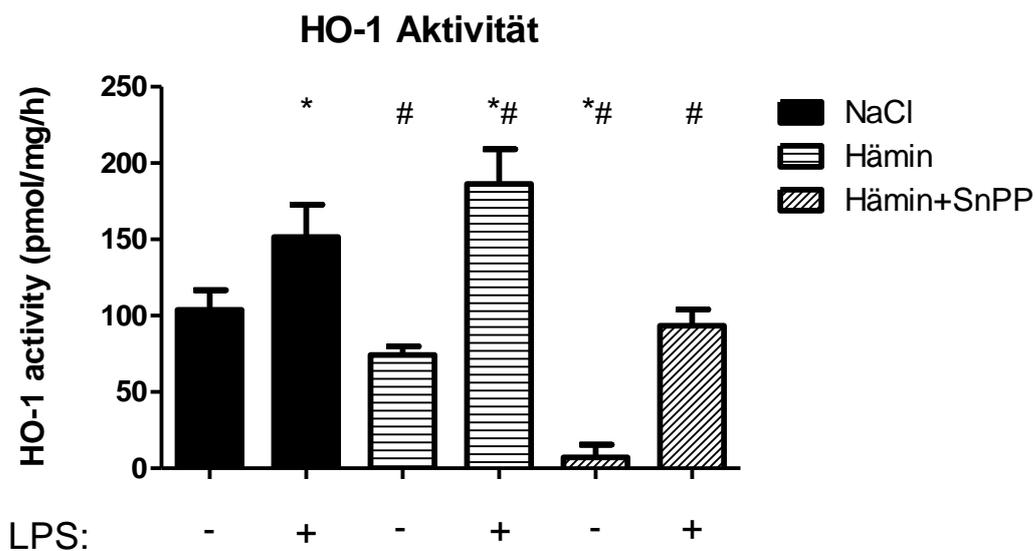


Abbildung 3-12: HO-1-Aktivitätsmessung im Lungengewebe von Wildtypieren⁵⁹. Es sind Mittelwerte angegeben \pm Standardabweichung, n=4 in allen Gruppen. * p<0,05 zur Kontrollgruppe ohne LPS; # p<0,05 zur Kontrollgruppe mit LPS.

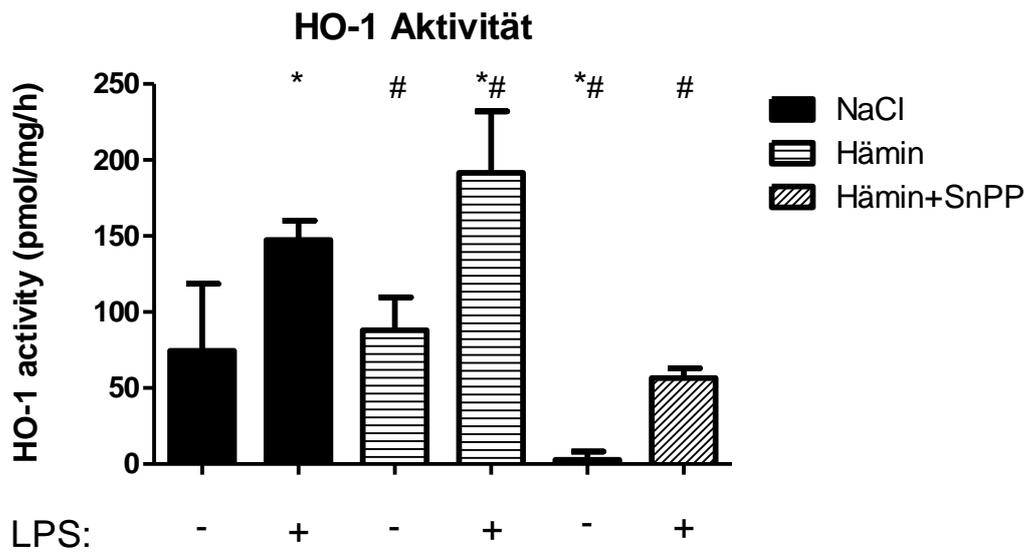


Abbildung 3-13: HO-1-Aktivitätsmessung im Lungengewebe bei HMOX flox/flox-Mäusen⁵⁹. Es sind Mittelwerte angegeben \pm Standardabweichung, n=6 in Gruppen mit LPS-Induktion, n=4 in den Gruppen ohne LPS-Behandlung. * p<0,05 zur Kontrollgruppe ohne LPS; # p<0,05 zur Kontrollgruppe mit LPS.

4. Diskussion

Die anti-inflammatorische Wirkung der HO-1 konnte in verschiedenen Tiermodellen, in denen starke Entzündungsreaktionen ausgelöst wurden, wie akuter Lungenschaden, septischer Ileus, Myokardinfarkt oder Schädigung der Haut durch Strahlung, gezeigt werden^{54,60-65}. Dennoch sind die genauen Mechanismen der anti-inflammatorische Wirkung der HO-1 immer noch unklar.

In einigen Arbeiten wurde der Effekt einer vollständigen HO-1-Defizienz untersucht. Der Großteil der HO-1 knockout Tiere ist nicht lebensfähig und stirbt bereits intrauterin³³. Die überlebenden Tiere weisen ein gegenüber Wildtyptieren vermindertes Körpergewicht auf und haben eine verminderte Lebenserwartung. Sie haben einen gestörten Eisenstoffwechsel, der mit einer Eisenmangelanämie und Eisenablagerungen in Leber und Niere einhergeht. Bei den Tieren liegt eine chronische Inflammation vor, und es konnten Atherosklerose und Entzündungen der Arterien beobachtet werden⁶⁶. Gegenüber inflammatorischen Stimuli zeigen sie eine hohe Vulnerabilität. So führt die Applikation einer für Wildtyptiere nicht-letalen Dosis von LPS zu einer sehr hohen Letalität⁶⁷.

Um den Einfluss dieser chronischen Inflammation in reinen HO-1 knockout Tieren auf den Verlauf der akuten LPS-induzierten Inflammation in dieser Arbeit auszuschließen, wurden HMOX flox/flox-Mäuse verwendet, die die myeloide HO-1 nicht exprimieren. Sie sind vital, fertil und weisen vor Induktion der Inflammation keine phänotypischen Unterschiede zu den entsprechenden Wildtyptieren auf, wie auch in der vorliegenden Arbeit histologisch und im Ausgangsblutbild nachgewiesen wurde.

Durch die Untersuchung wesentlicher pathophysiologischer Merkmale der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation, wie der Einwanderung von PMNs in die Lunge, der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in den Alveolarraum und der Entwicklung einer mikrovaskulären Permeabilitätserhöhung, konnte die Schwere der Entzündungsreaktion zwischen Wildtyp- und HMOX flox/flox-Tieren verglichen werden. Dabei fiel im Vergleich

zwischen Wildtyp- und HMOX flox/flox-Tieren überraschenderweise kein Unterschied auf. Die HO-1-Induktion durch Hämin führte bei den HMOX flox/flox-Mäusen zu denselben anti-inflammatorischen Effekten wie bei den Wildtyp-Tieren. Demnach scheint der anti-inflammatorische Effekt der HO-1-Induktion vor allem über die nicht-myeloide HO-1 vermittelt zu werden, während in der vorliegenden Arbeit kein wesentlicher Einfluss der myeloiden HO-1 auf das Inflammationsgeschehen in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation sichtbar wurde.

Die Einwanderung von PMNs in die Lunge ist ein zentraler Pathomechanismus in der akuten pulmonalen Inflammation⁶⁸. Obwohl die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten essentiell in der angeborenen Immunantwort ist und somit eine wichtige Voraussetzung für die Verteidigung des Organismus ist, kann die überschießende Aktivierung von Neutrophilen und die damit verbundene Freisetzung von zytotoxischen Stoffen zu Gewebeschäden führen. Es konnte gezeigt werden, dass die verminderte Migration von PMNs zu geringeren Gewebeschäden führt und mit einer erhöhten Überlebensrate einhergeht⁶⁹. Die Reduktion der PMN-Einwanderung in die Lunge hat dementsprechend einen hohen Stellenwert bei einer anti-inflammatorischen Therapie der akuten pulmonalen Inflammation.

In der vorliegenden Arbeit verminderte die Induktion der HO-1 den Einstrom von PMNs in die Lunge sowohl in Wildtyp-Tieren als auch in den HMOX flox/flox-Mäusen, ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Mauslinien. Die durch HO-1-Induktion verminderte PMN-Migration in das Gewebe wurde auch in der *in vivo*-Mikroskopie von FREITAS et al. beobachtet, wo die HO-1-Wirkung auf die Migration von PMNs in Mesenterialgefäßen untersucht wurde⁷⁰. Demnach führte die HO-1 zu einem verminderten Rolling und einer geringeren Adhäsion von PMNs am Endothel. Ein Mechanismus, der dabei dem verminderten PMN-Einstrom in die Lunge bei HO-1-Induktion zugrunde liegen könnte, wurde von VACHHARAJANI et al. gezeigt⁷¹. In LPS-behandelten Ratten wurden in verschiedenen Organen die Expression von Selektinen auf dem Endothel gemessen, die das Rolling der Leukozyten auf dem Endothel als wichtigen Schritt

bei der PMN-Migration vermitteln. Die HO-1-Induktion mittels Hämin senkte die LPS-induzierte P-Selektin-Hochregulation des Endothels in der Lunge und in anderen Organen. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei Experimenten mit oxidativem Stress bei Ratten ermittelt. Dabei wurde eine verminderte Leukozytenadhärenz nach HO-1-Induktion in mesenterialen Mikrogefäßen festgestellt, die auf die Herunterregulation von P-Selektin im Endothel zurückgeführt wurde⁷². In beiden Studien wurde demonstriert, dass die HO-1-Aktivität im Endothel über die verminderte Expression von Selektinen zu vermindertem Rolling von PMNs und dadurch zu einer reduzierten PMN-Einwanderung ins Gewebe beiträgt. Das steht im Einklang mit dem Ergebnis dieser Arbeit, da die endotheliale HO-1 einen Teil der nicht-myeloiden HO-1 darstellt.

Während der akuten pulmonalen Inflammation kommt es zur mikrovaskulären Permeabilitätserhöhung. Eine Studie zur Wirkung der HO-1 auf die Entstehung von Lungenödemen zeigte, dass die Induktion der HO-1 die Schwere des entstehenden Lungenödems in Wildtypmäusen vermindert⁶⁰. Dabei führte die HO-1 zu einer vermehrten Expression von Occludin und Zona Occludin-1 (ZO-1) in Lungenepithelzellen und zu einer Abnahme der Apoptose von pulmonalen Epithel- und Endothelzellen. Occludin und ZO-1 sind Proteine, die als Teil des Tight junction Komplexes eine Barriere gegen den parazellulären Austausch von Flüssigkeiten und Immunzellen bilden und die von alveolaren Epithelzellen exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass die Entstehung des mikrovaskulären Lecks sowohl in Wildtyp- als auch in HMOX flox/flox-Mäusen durch HO-1-Induktion verhindert werden konnte. Dies hebt die herausragende Bedeutung der nicht-myeloiden HO-1 für die Stabilisierung des Kapillarlecks hervor.

Zytokine sind wichtige Mediatoren bei der Inflammation und beeinflussen den Verlauf der Entzündungsreaktion. In dieser Arbeit wurden die Zytokine TNF- α und IL-6 gemessen, die als proinflammatorische Zytokine eine wesentliche Rolle in der pulmonalen Inflammation spielen. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass IL-6 die CXCL1-Produktion im Lungenendothel stimuliert und somit zur

Neutrophileninfiltration und zum Lungenschaden beiträgt⁷³. IL-6-defiziente Mäuse oder Mäuse, die mit einem IL-6-Antikörper behandelt wurden, wiesen einen reduzierten Lungenschaden nach akutem Nierenversagen auf⁷⁴. TNF- α vermittelt seinen proinflammatorischen Einfluss unter anderem durch die Beeinflussung endothelialer und epithelialer Tight-junction-Proteine und führt so zu einer Störung der Lungenbarriere²¹. In einem Tiermodell, bei dem ein letaler Schock ausgelöst wurde, führte die Depletion von TNF- α dazu, dass die Tiere überlebten⁷⁵. Die Chemokine CXCL1 und CXCL2/3 üben in Mäusen einen starken chemotaktischen Einfluss auf die Migration von PMNs aus und spielen daher ebenso eine wichtige Rolle im Krankheitsgeschehen der pulmonalen Inflammation. So konnte gezeigt werden, dass es nach intratrachealer Applikation von rekombinantem CXCL1 zum dosisabhängigen Einstrom von PMNs in die Lunge kam⁷⁶. Neutralisierende Antikörper gegen CXCL1 verminderten die PMN-Akkumulation in der Lunge nach LPS-Applikation um etwa 70%. Auch CXCL2/3 ist ein starker Mediator chemotaktischer Aktivität bei LPS-induziertem Lungenschaden⁷⁷. Dabei führte die Blockade von CXCL2/3 von einer deutlichen Abnahme des PMN-Einstroms in die Lunge und zu einem verminderten mikrovaskulären Leck in den Lungengefäßen. Wie bei der Einwanderung von PMNs in die Lunge zeigt sich auch hier, dass einerseits die exzessive Freisetzung von Chemokinen ein relevanter Pathomechanismus im ARDS ist, aber andererseits Chemokine eine wichtige Funktion für die Erradikation von Erregern haben. So führte zum Beispiel die vollständige Depletion von CXCL2/3 in einem Tiermodell mit bakterieller Pneumonie zu einer erhöhten Mortalität aufgrund der eingeschränkten Erregerabwehr⁷⁸.

In der vorliegenden Arbeit wurde innerhalb kurzer Zeit nach Auslösung der pulmonalen Inflammation IL-6, TNF- α , CXCL1 und CXCL2/3 in den Alveolarraum freigesetzt, wobei die HO-1-Induktion zu einer signifikanten Reduktion aller gemessenen Zytokine und Chemokine führte. Die Verminderung an proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen nach HO-1-Induktion stimmt überein mit den Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls antiinflammatorische Eigenschaften der HO-1 untersucht haben. So konnte durch Überexpression der HO-1 *in vitro* die LPS-induzierte TNF- α -Produktion

vermindert werden, und *in vivo* führte die Behandlung mit dem HO-1-Metaboliten CO zur dosisabhängigen Senkung der TNF- α -Produktion nach intraperitonealer LPS-Applikation³⁹. BORTSCHER et al. demonstrierten eine signifikante IL-6-Reduktion nach HO-1-Induktion in einem LPS-induzierten Ileus-Modell in Ratten⁶². In einem Mäusemodell mit Indomethacin-verursachtem intestinaleem Schaden verminderte HO-1-Induktion die Produktion von TNF- α und von CXCL1 sowie weiteren Chemokinen⁷⁹. Die Überexpression der nicht-myeloiden HO-1 führte zu einer verminderten BAL-Konzentration von CXCL2/3 bei Mäusen nach intraperitonealer LPS-Injektion⁸⁰.

In einer Arbeit von TZIMA et al., in der die inflammatorische Antwort von HO-1-defizienten Makrophagen im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen untersucht wurde, wurde die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit LPS gemessen⁸¹. Dabei wurde, übereinstimmend mit den Daten dieser Arbeit, kein Unterschied bei HO-1-Defizienz festgestellt. Makrophagen wurden aus Mäusen isoliert, die für die myeloide HO-1 defizient waren, und mit LPS *in vitro* stimuliert. Dabei zeigte sich gegenüber den Makrophagen von Kontrollmäusen kein Unterschied bei der Produktion von TNF und IL-6. Diesen Autoren zufolge liegt es wahrscheinlich an der Art des inflammatorischen Stimulus, ob die myeloide HO-1 eine Rolle bei der zellulären Immunantwort spielt. Bei Stimulation mit LPS wird die zelluläre Immunantwort primär über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) vermittelt. TZIMA et al. postulieren dabei eine frühe Phase der Inflammation, die unabhängig von der myeloiden HO-1 ist und zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt. Diese Einschätzung stimmt insofern mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, als dass auch in dieser Arbeit kein relevanter Einfluss der myeloiden HO-1 auf den Verlauf der LPS-induzierten Inflammation festgestellt werden konnte, wie in der Lungenhistologie, der Messung der PMNs in den verschiedenen Lungenkompartimenten und der Quantifizierung der mikrovaskulären Permeabilität gezeigt wurde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im scheinbaren Widerspruch zu den Resultaten anderer Arbeiten, die durchaus anti-inflammatorische Effekte der myeloiden HO-1 bei Versuchen mit isolierten Makrophagen beobachten konnten.

So konnte nach Überexpression der HO-1 durch Transfektion mit Plasmiden und nach Induktion der HO-1 durch Präkonditionierung durch Isofluran die verminderte Produktion von TNF- α in Makrophagen *in vitro* nachgewiesen werden^{39,82}. Man kann also davon ausgehen, dass die myeloide HO-1 durchaus einen anti-inflammatorischen Effekt vermittelt, dieser jedoch ungleich geringer ist als der der nicht-myeloiden HO-1, wodurch die Defizienz der myeloiden HO-1 in der vorliegenden Arbeit durch die nicht-myeloide HO-1 kompensiert werden konnte. Das deckt sich auch mit den Ergebnissen der HO-1-Aktivitätsmessung, bei der kein Unterschied zwischen Wildtypmäusen und HO-1 flox/flox-Mäusen festzustellen war.

TZIMA et al. diskutieren in ihrer Arbeit des Weiteren eine Spätphase der Inflammation, die durchaus von der myeloiden HO-1 abhängig sein soll. Sie stützen sich dabei auf Ergebnisse von LEE et al., die zeigten, dass IL-10 die Expression der HO-1 induziert und dadurch in Makrophagen die Freisetzung von TNF- α nach LPS-Stimulation reduziert⁸³. Dabei konnte *in vivo* durch die IL-10-Gabe ein starker protektiver Effekt im Rahmen eines LPS-induzierten septischen Schocks erzielt werden. Die beobachtete Senkung der TNF- α -Spiegel im Serum wurde dabei als ursächlich für die anti-inflammatorische Wirkung der HO-1 angesehen. In der vorliegenden Arbeit konnten durch HO-1-Induktion sowohl in Wildtyp- als auch in HMOX flox/flox-Mäusen die Freisetzung von TNF- α in den Bronchoalveolarraum vermindert werden. Die vorliegende Arbeit demonstriert dadurch, dass die nicht-myeloide HO-1 für die Senkung der TNF- α -Spiegel nach HO-1-Induktion verantwortlich ist.

Während die Konzentrationen von TNF- α bei den HMOX flox/flox-Mäusen gegenüber den Wildtyptieren signifikant erhöht waren, wurden deutlich geringere Konzentrationen von CXCL1 in der BAL gemessen. Dabei blieb allerdings die relative Änderung der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in der BAL durch HO-1-Induktion/-Inhibition für alle gemessenen Zytokine und Chemokine gleich. Die Unterschiede der TNF- α - und CXCL1-Konzentrationen führten zu keinem signifikanten Unterschied in der PMN-Migration, was vermuten lässt, dass sich

die Effekte der verminderten CXCL1-Sekretion durch die gleichzeitig erhöhten TNF- α -Level bei den HMOX flox/flox-Tieren ausgeglichen haben.

Die Inhibition der HO-1 führte bei beiden Mauslinien zu einem Anstieg von CXCL1, wodurch sich die verstärkte Migration der PMNs in die Lunge erklären lässt. Die intraalveoläre Konzentrationen von TNF- α , IL-6 und CXCL2/3 unterschieden sich nach HO-1-Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht. Das könnte daran liegen, dass durch den starken inflammatorischen Stimulus der LPS-Inhalation bereits die maximal mögliche Freisetzung dieser Zytokine und Chemokine ausgelöst wurde und eine stärkere Freisetzung nicht mehr möglich war.

Die HO-1-Aktivität in der Lunge stieg in Wildtyp- und HMOX flox/flox-Mäusen gleichermaßen nach LPS-Inhalation. Dieser Anstieg der HO-1-Aktivität durch Induktion der pulmonalen Inflammation zeigt, dass die HO-1 als Stressenzym durch den Entzündungsstimulus in physiologischer Weise hochreguliert wird. Diese Aktivitätserhöhung hat bereits einen geringen anti-inflammatorischen Effekt, da in der Gruppe, in der die HO-1 mittels SnPP inhibiert wurde, eine verstärkte Inflammationsreaktion beobachtet wurde. Die Vorbehandlung mit Hämin erhöhte die HO-1-Aktivität signifikant über das Niveau der Kontrollgruppe und führte zu den beschriebenen anti-inflammatorischen Effekten. Das zeigt, ebenso wie die Umkehrbarkeit der HO-1-Effekte durch pharmakologische Inhibition der HO-1, dass die beobachteten antiinflammatorischen Effekte auf den Einfluss der HO-1 zurückzuführen sind und nicht auf eventuelle andere Einflussfaktoren.

In der Immunfluoreszenz-Darstellung der HO-1-Expression in der Lungenhistologie wurde sichtbar, dass die Alveolarmakrophagen in den HMOX flox/flox-Mäusen die HO-1 nicht exprimieren und bestätigen damit den Erfolg der HO-1-Deletion auf myeloiden Zellen. Die Tatsache, dass sich die PMN-Einwanderung in Lunge und die Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität nach LPS-Inhalation in Wildtypmäusen und HMOX flox/flox-Mäusen nicht unterschieden, scheint nicht auf einer kompensatorischen Erhöhung der nicht-myeloiden HO-1-Expression bei den HMOX flox/flox-Mäusen zu beruhen, da die

nicht-myeloide HO-1 in der Immunfluoreszenz im Vergleich zu den Wildtypmäusen nicht stärker angefärbt wurde. Dementsprechend konnte auch bei der Messung der HO-1-Aktivität in der Lunge kein Unterschied zwischen beiden Mauslinien festgestellt werden. Vielmehr bestätigt dieses Ergebnis den relevanten anti-inflammatorischen Einfluss der nicht-myeloiden HO-1 in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation.

Durch Applikation von Hämin konnte in dieser Arbeit ein starker anti-inflammatorischer Effekt erzielt werden. So wurde durch die pharmakologische Induktion der HO-1 mittels Hämin eine verminderte Einwanderung von PMNs in die verschiedenen Lungenkompartimente, geringere Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen im Bronchoalveolarraum und die Stabilisierung der mikrovaskulären Permeabilität erreicht. Auch in einigen anderen *in vivo*-Studien führte die Hämin-Gabe zu anti-inflammatorischen Effekten. Bei LPS-induziertem Ileus in Ratten konnten nach Hämin-Applikation anti-inflammatorischen Effekten beobachtet werden⁶², bei Indomethacin-induzierter Schädigung des Dünndarms wurden durch Gabe von Hämin protektive Effekte erreicht⁷⁹ und das Ausmaß des Nierenschadens durch Mineralokortikoid-induzierte Hypertension konnte ebenfalls durch Hämin-Therapie vermindert werden⁸⁴. Erste Studien bei Menschen zeigten, dass die HO-1 durch intravenöse Gabe von Hämin induziert werden konnte, wobei keine schwerwiegenden Nebenwirkungen festgestellt wurden⁸⁵. Auch im Krankheitsverlauf des ARDS spielt die HO-1 eine protektive Rolle. Beispielsweise haben Patienten, die aufgrund eines Polymorphismus im Promotor des HO-1-Gens erhöhte Plasmaspiegel der HO-1 aufweisen, ein geringeres Risiko für die Entwicklung eines ARDS⁸⁶. Diese Arbeit unterstreicht dabei den Stellenwert der HO-1 als therapeutisches Target im ARDS.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Inhalation von LPS eine akute pulmonale Inflammation ausgelöst. Die LPS-induzierte pulmonale Inflammation eignet sich gut als Modell, um das ARDS zu simulieren, da Pneumonien mit gram-negativen Erregern eine häufige Ursache für das ARDS darstellen⁷ und es sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit auszeichnet. In diesem Modell wird die pulmonale

Inflammation allerdings nur durch Oberflächenproteine von Bakterien ausgelöst, eine echte immunologische Auseinandersetzung mit lebenden Bakterien findet nicht statt. Außerdem wird die Komplexität des ARDS als systemische Erkrankung durch die in der Lunge stattfindende Entzündung nur teilweise abgebildet.

Diese Arbeit zeigt wesentliche Aspekte der anti-inflammatorischen Wirkung der HO-1, dennoch ist weitergehende Forschung nötig, um die Rolle der HO-1 als Therapieziel im ARDS zu evaluieren. Insgesamt ist die Wirkung der HO-1 auf den Verlauf von systemischen Inflammationssyndromen noch unklar. Diese und weitere Arbeiten weisen darauf hin, dass die Induktion der HO-1 zu einer anti-inflammatorischen und dadurch protektiven Wirkung bei Entzündungsgeschehen führt, weshalb man in der Beeinflussung der HO-1 eine vielversprechende Therapiemöglichkeit bei der Behandlung des ARDS sieht. Dagegen wurde in einer anderen Studie, in der durch Ligatur und Punktion des Zäkums eine Sepsis ausgelöst wurde, gezeigt, dass initiale HO-1-Inhibition kurz vor Auslösung der Sepsis zu einer Verminderung der Mortalität führte⁸⁷. Dieser scheinbare Widerspruch weist einerseits auf die Komplexität der HO-1-Wirkung hin und zeigt andererseits den weitergehenden Forschungsbedarf, um das Potential einer Therapie durch HO-1-Induktion oder Applikation von Metaboliten der HO-1 wie CO oder Biliverdin/Bilirubin besser einschätzen zu können.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte die protektive Wirkung der nicht-myeloiden HO-1 in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation nachgewiesen werden.

Das ARDS ist ein akut einsetzendes Krankheitsbild mit einer hohen Letalität, für das es derzeit keine kausalen Therapieoptionen gibt. Pathophysiologisch kommt es dabei zur massiven Einwanderung von PMNs in die Lunge, die Permeabilität der Lungengefäße wird stark erhöht, wodurch ein Lungenödem und eine Oxygenierungsstörung in der Lunge entstehen. Proinflammatorische Zytokine und Chemokine werden freigesetzt und dadurch das Entzündungsgeschehen weiter verstärkt.

Die HO-1 ist ein Enzym, das den Abbau von Häm zu CO, Biliverdin und Eisen katalysiert und die anti-inflammatorischen Eigenschaften aufweist. Physiologisch wird die HO-1 kaum exprimiert, bei Inflammation kommt es jedoch zur Hochregulation der HO-1. Neben Auslösern, die mit oxidativem Stress oder Entzündungsreaktionen assoziiert sind, wie bakteriellen Endotoxinen, Hypo- oder Hyperoxie oder Ischämie-Reperfusionsschaden, kann die HO-1 auch durch Applikation von Hämin induziert werden. Die Modulation der HO-1 ist ein vielversprechendes Therapieziel bei der Behandlung des ARDS.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Induktion der HO-1 mittels Hämin zu einer protektiven Wirkung in der akuten LPS-induzierten pulmonalen Inflammation führt. Durch den Vergleich von Wildtyp- mit HMOX flox/flox-Mäusen, bei denen die HO-1 auf myeloiden Zellen nicht exprimiert wird, wurde sichtbar, dass sich diese protektiven Effekte auf die Wirkung der nicht-myeloiden HO-1 zurückführen lassen. Der anti-inflammatorische Einfluss der HO-1 konnte dabei durch Quantifizierung der PMN-Migration in die verschiedenen Lungenkompartimente (Intravasalraum, Interstitium, Alveolarraum), Messung der mikrovaskulären Permeabilitätserhöhung durch Evans blue Extravasationstechnik und durch Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine in der BAL, IL-6, TNF- α , CXCL1, CXCL2/3,

demonstriert werden. Durch HO-1-Induktion wurde dabei eine verminderte Einwanderung von PMNs in die Lunge erreicht und die Entstehung des Endothellecks war deutlich verringert. Der protektive Effekt der HO-1-Induktion zeigte sich sowohl in den Wildtypmäusen, als auch unvermindert in den HMOX flox/flox-Mäusen. Die Inhibition der HO-1 führte zu einer Verstärkung der pulmonalen Inflammation mit erhöhter Einwanderung von PMNs in die Lunge und einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität in beiden Mauslinien.

Bei der Messung der bronchoalveolären Konzentration der Zytokine und Chemokine zeigte sich bei beiden Mauslinien eine signifikante Verminderung bei HO-1-Induktion, wobei die Konzentrationen an TNF- α bei den HMOX flox/flox-Tieren insgesamt gegenüber den Wildtyptieren erhöht waren, während die CXCL1-Konzentrationen gegenüber den Wildtyptieren vermindert war. Da diese Unterschiede jedoch zu keinem Unterschied im Migrationsverhalten der PMNs führten, kann man davon ausgehen, dass sich die Effekte der verminderten CXCL1-Sekretion durch die gleichzeitig erhöhten TNF- α -Spiegel ausgeglichen haben.

Diese Arbeit demonstriert die anti-inflammatorische und protektive Wirkung der nicht-myeloiden HO-1 in der akuten pulmonalen Inflammation und unterstreicht somit die Bedeutung der HO-1 als mögliches Therapieziel bei der Behandlung des ARDS. Allerdings gibt es noch viele Unklarheiten über die Wirkung der HO-1 während der Inflammation, weshalb weitergehende Forschung nötig ist.

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| ABC | Avidin-Biotin-Complex |
| AECC | American-European Consensus Conference |
| AK | Antikörper |
| ALI | Acute Lung Injury |
| ARDS | Acute Respiratory Distress Syndrome |
| BAL | bronchoalveoläre Lavage |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CO | Kohlenstoffmonoxid |
| CORM | Carbon monoxide releasing molecule |
| CPAP | Continuous Positive Airway Pressure, kontinuierliche Überdruckbeatmung |
| CXCL | Chemokinligand |
| CXCR | Chemokinrezeptor |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| FSGO | Fish Skin Gelatine Oil |
| Hb | Hämoglobin |
| HO | Hämoxygenase |
| HO-1 | Hämoxygenase-1 |
| HO-2 | Hämoxygenase-2 |
| HO-3 | Hämoxygenase-3 |
| HRP | Horse Radish Peroxidase, Meerrettichperoxidase |
| i.p. | Intraperitoneal |
| i.v. | Intravenös |
| ICAM-1 | Intracellular adhesion molecule-1 |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| KC | Keratinocyte-derived Chemokine |
| LPS | Lipopolysaccharid |

| | |
|-----------------|--|
| MIP-2 | Macrophage Inflammatory Protein-2 |
| NADPH | Nicotinamidadeninukleotidphosphat |
| NS | Nicht signifikant |
| p | Signifikanzwert |
| p_aO_2/F_iO_2 | Quotient aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischer Sauerstoffkonzentration |
| PBS | Phosphat Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung |
| PEEP | Positive endexpiratory pressure, positiver endexpiratorischer Druck |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMN | Polymorphonukleärer Leukozyt |
| ROS | Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauerstoffspezies |
| RPM | Rounds per Minute, Umdrehungen pro Minute |
| SnPP | Zinn-Protoporphyrin |
| TLR4 | Toll-like Rezeptor 4 |
| TNF- α | Tumor Necrosis Factor-Alpha |
| VCAM-1 | Vascular Cell Adhesion Molecule-1 |
| ZO-1 | Zona Occludin-1 |

7. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Häm-Abbau durch die katalytische Funktion der HO-1..... | 13 |
| Abbildung 2-1: Vernebelung von LPS-Lösung..... | 24 |
| Abbildung 2-2: Versuchsprotokoll der HO-1-Induktion bzw. HO-1-Inhibition | 25 |
| Abbildung 2-3: Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse mit FlowJo. | 33 |
| Abbildung 2-4: Auswertung der CD45-positiven Leukozyten..... | 33 |
| Abbildung 2-5: Darstellung der Isotypenkontrolle..... | 34 |
| Abbildung 3-1: Lungenhistologie mit immunhistochemischer Anfärbung von PMNs | 43 |
| Abbildung 3-2: Lungenhistologie mit immunhistochemischer Anfärbung von PMNs | 44 |
| Abbildung 3-3: Lungenhistologie mit Darstellung der HO-1 mittels Immunfluoreszenz..... | 46 |
| Abbildung 3-4: Überblick über die Anzahl an PMNs in den verschiedenen Lungenkompartimenten bei Wildtyptieren ohne LPS-Inhalation..... | 47 |
| Abbildung 3-5: Überblick über die Anzahl an PMNs in den verschiedenen Lungenkompartimenten bei HMOX flox/flox-Mäusen ohne LPS-Inhalation..... | 48 |
| Abbildung 3-6: Anzahl an PMNs in den verschiedenen Lungenkompartimenten bei Wildtyptieren mit LPS-Inhalation..... | 50 |
| Abbildung 3-7: Anzahl an PMNs in den verschiedenen Lungenkompartimenten bei HMOX flox/flox-Mäusen mit LPS-Inhalation..... | 51 |
| Abbildung 3-8: Messung der Evans blue Extravasation bei Wildtypmäusen | 53 |
| Abbildung 3-9: Messung der Evans blue Extravasation bei HMOX flox/flox-Mäusen | 54 |
| Abbildung 3-10: Messung der Konzentrationen von TNF- α und IL-6 in der BAL. | 57 |
| Abbildung 3-11: Messung der Konzentrationen von CXCL1 und CXCL2/3 in der BAL. | 58 |

Abbildung 3-12: HO-1-Aktivitätsmessung im Lungengewebe von Wildtypieren..
..... 60

Abbildung 3-13: HO-1-Aktivitätsmessung im Lungengewebe bei HMOX flox/flox-
Mäusen. 61

8. Literaturverzeichnis

1. Tsushima, K., *et al.* Acute lung injury review. *Intern.Med.* **48**, 621-630 (2009).
2. Brun-Buisson, C., *et al.* Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med.* **30**, 51-61 (2004).
3. Rubenfeld, G.D. & Herridge, M.S. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest* **131**, 554-562 (2007).
4. Herold, G. *Innere Medizin*, (Herold, G., Köln, 2012).
5. Camporota, L. & Ranieri, V.M. What's new in the 'Berlin' definition of Acute Respiratory Distress Syndrome? *Minerva Anesthesiol.* (2012).
6. Hecker, M., Seeger, W. & Mayer, K. [The Berlin Definition : Novel criteria and classification of ARDS]. *Med.Klin.Intensivmed.Notfmed.* **107**, 488-490 (2012).
7. Reutershan, J. & Ley, K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit Care* **8**, 453-461 (2004).
8. Grommes, J. & Soehnlein, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol.Med.* **17**, 293-307 (2011).
9. Matthay, M.A., Ware, L.B. & Zimmerman, G.A. The acute respiratory distress syndrome. *The Journal of clinical investigation* **122**, 2731-2740 (2012).
10. Ware, L.B. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Seminars in respiratory and critical care medicine* **27**, 337-349 (2006).
11. Reutershan, J., Basit, A., Galkina, E.V. & Ley, K. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **289**, L807-L815 (2005).
12. Nauseef, W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological reviews* **219**, 88-102 (2007).
13. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846-852 (2002).
14. Panes, J., Perry, M. & Granger, D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *British journal of pharmacology* **126**, 537-550 (1999).
15. Muller, A.M., Cronen, C., Muller, K.M. & Kirkpatrick, C.J. Heterogeneous expression of cell adhesion molecules by endothelial cells in ARDS. *The Journal of pathology* **198**, 270-275 (2002).
16. Burns, A.R., Smith, C.W. & Walker, D.C. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiological reviews* **83**, 309-336 (2003).
17. Zemans, R.L., Colgan, S.P. & Downey, G.P. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **40**, 519-535 (2009).

18. Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Keane, M.P. & Standiford, T.J. Chemokines in lung injury: Thomas A. Neff Lecture. *Chest* **116**, 103S-110S (1999).
19. Zhang, J., *et al.* Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PloS one* **6**, e14525 (2011).
20. Rincon, M. & Irvin, C.G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *International journal of biological sciences* **8**, 1281-1290 (2012).
21. Mazzone, E. & Cuzzocrea, S. Role of TNF-alpha in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respiratory research* **8**, 75 (2007).
22. Miller, E.J., *et al.* Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *The American review of respiratory disease* **146**, 427-432 (1992).
23. Czermak, B.J., Friedl, H.P. & Ward, P.A. Role and Regulation of Chemokines in Rodent Models of Lung Inflammation. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* **40**, 163-166 (1999).
24. Reutershan, J., *et al.* Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *The Journal of clinical investigation* **116**, 695-702 (2006).
25. Konrad, F.M. & Reutershan, J. CXCR2 in acute lung injury. *Mediators of inflammation* **2012**, 740987 (2012).
26. Huang, S., Paulauskis, J.D., Godleski, J.J. & Kobzik, L. Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. *The American journal of pathology* **141**, 981-988 (1992).
27. Reutershan, J., Harry, B., Chang, D., Bagby, G.J. & Ley, K. DARC on RBC limits lung injury by balancing compartmental distribution of CXC chemokines. *European journal of immunology* **39**, 1597-1607 (2009).
28. Sue, R.D., *et al.* CXCR2 is critical to hyperoxia-induced lung injury. *Journal of immunology* **172**, 3860-3868 (2004).
29. Raval, C.M. & Lee, P.J. Heme oxygenase-1 in lung disease. *Curr. Drug Targets*. **11**, 1532-1540 (2010).
30. Ryter, S.W. & Choi, A.M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **41**, 251-260 (2009).
31. Hayashi, S., *et al.* Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* **336**, 241-250 (2004).
32. Fredenburgh, L.E., Perrella, M.A. & Mitsialis, S.A. The role of heme oxygenase-1 in pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **36**, 158-165 (2007).
33. Poss, K.D. & Tonegawa, S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 10919-10924 (1997).
34. Keyse, S.M. & Tyrrell, R.M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen

- peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 99-103 (1989).
35. Kawashima, A., Oda, Y., Yachie, A., Koizumi, S. & Nakanishi, I. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Human pathology* **33**, 125-130 (2002).
 36. Radhakrishnan, N., *et al.* Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. *Journal of pediatric hematology/oncology* **33**, 74-78 (2011).
 37. Yachie, A., *et al.* Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *The Journal of clinical investigation* **103**, 129-135 (1999).
 38. Ryter, S.W., Morse, D. & Choi, A.M. Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **36**, 175-182 (2007).
 39. Otterbein, L.E., *et al.* Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature medicine* **6**, 422-428 (2000).
 40. Furchgott, R.F. & Jothianandan, D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood vessels* **28**, 52-61 (1991).
 41. Tenhunen, R., Marver, H.S. & Schmid, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *The Journal of biological chemistry* **244**, 6388-6394 (1969).
 42. Sarady, J.K., *et al.* Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 854-856 (2004).
 43. Stocker, R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxidants & redox signaling* **6**, 841-849 (2004).
 44. Clark, J.E., Foresti, R., Green, C.J. & Motterlini, R. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *The Biochemical journal* **348 Pt 3**, 615-619 (2000).
 45. Sarady-Andrews, J.K., *et al.* Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **289**, L1131-1137 (2005).
 46. Nakao, A., *et al.* Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **5**, 282-291 (2005).
 47. Wagener, F.A., *et al.* Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* **98**, 1802-1811 (2001).
 48. Vile, G.F. & Tyrrell, R.M. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *The Journal of biological chemistry* **268**, 14678-14681 (1993).

49. Vile, G.F., Basu-Modak, S., Waltner, C. & Tyrrell, R.M. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 2607-2610 (1994).
50. Suttner, D.M. & Dennery, P.A. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 1800-1809 (1999).
51. Dennery, P.A., *et al.* Resistance to hyperoxia with heme oxygenase-1 disruption: role of iron. *Free radical biology & medicine* **34**, 124-133 (2003).
52. Platt, J.L. & Nath, K.A. Heme oxygenase: protective gene or Trojan horse. *Nature medicine* **4**, 1364-1365 (1998).
53. Lin, Q., *et al.* Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **282**, 20621-20633 (2007).
54. Inoue, S., *et al.* Transfer of heme oxygenase 1 cDNA by a replication-deficient adenovirus enhances interleukin 10 production from alveolar macrophages that attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Human gene therapy* **12**, 967-979 (2001).
55. Tamion, F., Richard, V., Renet, S. & Thuillez, C. Protective effects of heme-oxygenase expression against endotoxic shock: inhibition of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of interleukin-10. *The Journal of trauma* **61**, 1078-1084 (2006).
56. Ryter, S.W. & Choi, A.M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: novel therapeutic strategies in critical care medicine. *Curr. Drug Targets.* **11**, 1485-1494 (2010).
57. Lang, D., Reuter, S., Buzescu, T., August, C. & Heidenreich, S. Heme-induced heme oxygenase-1 (HO-1) in human monocytes inhibits apoptosis despite caspase-3 up-regulation. *International immunology* **17**, 155-165 (2005).
58. Hajdena-Dawson, M., *et al.* Effects of metalloporphyrins on heme oxygenase-1 transcription: correlative cell culture assays guide in vivo imaging. *Mol. Imaging* **2**, 138-149 (2003).
59. Konrad, F.M., Knausberg, U., Hone, R., Ngamsri, K.C. & Reutershan, J. Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation. *Mucosal immunology* (2015).
60. Xie, W., *et al.* Resolvin D1 reduces deterioration of tight junction proteins by upregulating HO-1 in LPS-induced mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **93**, 991-1000 (2013).
61. An, L., *et al.* Protective effects of hemin in an experimental model of ventilator-induced lung injury. *European journal of pharmacology* **661**, 102-108 (2011).
62. Bortscher, S., *et al.* Hemin induction of HO-1 protects against LPS-induced septic ileus. *J.Surg.Res.* (2012).
63. Clark, J.E., *et al.* Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **278**, H643-651 (2000).

64. Ockaili, R., *et al.* HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **289**, H542-548 (2005).
65. Zhang, S., *et al.* Amelioration of radiation-induced skin injury by adenovirus-mediated heme oxygenase-1 (HO-1) overexpression in rats. *Radiation oncology* **7**, 4 (2012).
66. Ishikawa, K., Navab, M. & Lusis, A.J. Vasculitis, Atherosclerosis, and Altered HDL Composition in Heme-Oxygenase-1-Knockout Mice. *International journal of hypertension* **2012**, 948203 (2012).
67. Poss, K.D. & Tonegawa, S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 10925-10930 (1997).
68. Abraham, E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med.* **31**, S195-S199 (2003).
69. Farmer, D.G., *et al.* Disruption of P-selectin signaling modulates cell trafficking and results in improved outcomes after mouse warm intestinal ischemia and reperfusion injury. *Transplantation* **80**, 828-835 (2005).
70. Freitas, A., *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *British journal of pharmacology* **149**, 345-354 (2006).
71. Vachharajani, T.J., Work, J., Issekutz, A.C. & Granger, D.N. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **278**, H1613-1617 (2000).
72. Hayashi, S., *et al.* Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circulation research* **85**, 663-671 (1999).
73. Ahuja, N., *et al.* Circulating IL-6 mediates lung injury via CXCL1 production after acute kidney injury in mice. *American journal of physiology. Renal physiology* **303**, F864-872 (2012).
74. Klein, C.L., *et al.* Interleukin-6 mediates lung injury following ischemic acute kidney injury or bilateral nephrectomy. *Kidney international* **74**, 901-909 (2008).
75. Ito, H., *et al.* Lethal endotoxic shock using alpha-galactosylceramide sensitization as a new experimental model of septic shock. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **86**, 254-261 (2006).
76. Frevert, C.W., Huang, S., Danaee, H., Paulauskis, J.D. & Kobzik, L. Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. *Journal of immunology* **154**, 335-344 (1995).
77. Schmal, H., Shanley, T.P., Jones, M.L., Friedl, H.P. & Ward, P.A. Role for macrophage inflammatory protein-2 in lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *Journal of immunology* **156**, 1963-1972 (1996).
78. Greenberger, M.J., *et al.* Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in

- murine *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases* **173**, 159-165 (1996).
79. Yoriki, H., *et al.* Hemin ameliorates indomethacin-induced small intestinal injury in mice through the induction of heme oxygenase-1. *Journal of gastroenterology and hepatology* **28**, 632-638 (2013).
 80. Zampetaki, A., Minamino, T., Mitsialis, S.A. & Kourembanas, S. Effect of heme oxygenase-1 overexpression in two models of lung inflammation. *Experimental biology and medicine* **228**, 442-446 (2003).
 81. Tzima, S., Victoratos, P., Kranidioti, K., Alexiou, M. & Kollias, G. Myeloid heme oxygenase-1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN-beta production. *The Journal of experimental medicine* **206**, 1167-1179 (2009).
 82. Li, Q.F., Zhu, Y.S., Jiang, H., Xu, H. & Sun, Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of isoflurane preconditioning in LPS-stimulated macrophages. *Acta pharmacologica Sinica* **30**, 228-234 (2009).
 83. Lee, T.S. & Chau, L.Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nature medicine* **8**, 240-246 (2002).
 84. Jadhav, A., Torlakovic, E. & Ndisang, J.F. Hemin therapy attenuates kidney injury in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *American journal of physiology. Renal physiology* **296**, F521-534 (2009).
 85. Bharucha, A.E., *et al.* First-in-human study demonstrating pharmacological activation of heme oxygenase-1 in humans. *Clinical pharmacology and therapeutics* **87**, 187-190 (2010).
 86. Sheu, C.C., *et al.* Heme oxygenase-1 microsatellite polymorphism and haplotypes are associated with the development of acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* **35**, 1343-1351 (2009).
 87. Freitas, A., *et al.* Divergent role of heme oxygenase inhibition in the pathogenesis of sepsis. *Shock* **35**, 550-559 (2011).

9. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. Jörg Reutershan und Frau Dr. med. Franziska Konrad.

Die Versuche wurden von mir mit Unterstützung von Franziska Konrad und nach Einarbeitung durch Irene Vollmer durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Franziska Konrad durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 26.06.2015



10. Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Konrad, F.M., Knausberg, U., Hone, R., Ngamsri, K.C. & Reutershan, J. Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation. *Mucosal immunology* (2015).

Alle Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit, die in der obengenannten Publikation bereits veröffentlicht wurden, sind entsprechend gekennzeichnet.

11. Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Franziska Konrad für die hervorragende Betreuung während der Durchführung der Versuche und der schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit bedanken. Ein großer Dank gilt auch Irene Vollmer, die mich sehr gut in die Durchführung der Versuche eingearbeitet hat und die während der gesamten Arbeit im Labor immer ein freundlicher und verlässlicher Ansprechpartner für mich war. Ich danke Jörg Reutershan für die freundliche Unterstützung bei der gesamten Doktorarbeit und bei der Bewerbung für das IZKF Promotionskolleg.

Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium des IZKF Promotionskollegs der Universität Tübingen unterstützt, das ich vom April 2012 bis März 2013 erhalten habe. Dabei möchte ich mich insbesondere bei Tanja Rieß, Marlies Knippers und Inka Montero für die Begleitung des Promotionskollegs bedanken.