Einfluss von 18-Hydroxyeikosapentaensäure und des Chemerin 23 Rezeptors auf die Transmigration und Apoptose von Leukozyten im Mausmodell des ARDS („*acute respiratory distress syndrom*“)

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Möller, Matthias
aus Otterndorf

Gießen 2023

Einfluss von 18-Hydroxyeikosapentaensäure und des Chemerin 23 Rezeptors auf die Transmigration und Apoptose von Leukozyten im Mausmodell des ARDS („*acute respiratory distress syndrom*“)

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Möller, Matthias
aus Otterndorf

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Medizinische Klinik und Poliklinik II
Pneumologie und Internistische Intensivmedizin, Infektiologie, Gastroenterologie, Nephrologie

Gutachter: Prof. Dr. Konstantin Mayer

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorff

Tag der Disputation: 01. August 2024

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	1
1.1	Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau der Lunge	1
1.2	Entstehungsprozesse von Entzündungsreaktionen in der Lunge, die zu einem akuten Lungenversagen führen können	2
1.2.1	Definition des akuten Lungenversagens	2
1.2.2	Ätiologie und Klinik des akuten Lungenversagens	3
1.2.3	Pathophysiologie des akuten Lungenversagens	4
1.2.4	Permeabilität der Lungenkapillaren und die Ausbildung eines Lungenödems	5
1.3	Pulmonal-zelluläre Antwort auf Entzündungstimuli beim ARDS	6
1.3.1	LPS-vermittelte Signaltransduktion	6
1.3.2	Proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine und Lipidmediatoren	8
1.3.3	Wirkung von Chemokinen bei der entzündungsbedingten, endothelialen Transmigration von Leukozyten	10
1.4	Pathophysiologischer Zusammenhang zwischen entzündungsbedingter-endothelialer Transmigration, der Entstehung eines Lungenödems und der Etablierung von ARDS	12
1.5	Die ChemR23-KO-Maus: Ein Modell für die Studie von Defekten der Chemokin-vermittelten Leukozytentransmigration und der Resolution entzündlicher Prozesse in der Lunge	13
1.5.1	Der Chemokin-Rezeptor 23 und seine Liganden Chemerin und Resolvin E1	13
1.5.2	Resolvin-vermittelte Resolution inflammatorischer Prozesse	15
1.6	Apoptose- und Nekroseprozesse im Rahmen einer Entzündungsreaktion	16
1.7	Lipide und Lipidmediatoren	17
1.7.1	Ausbildung unterschiedlicher Lipidmediatoren durch die Verstoffwechslung von PUFAs	18
1.7.2	Entzündungshemmender Effekt von Ω-3-Fettsäuren-Derivaten	21
1.8	Fragestellung	25
2	**Material und Methoden**	26
2.1	Material	26
2.1.1	Tiere und Material für Tierhaltung und Tierversuche	26
2.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	26

2.1.3 Chemikalien 27
2.1.4 Antikörper 28
2.2 Methoden 30
2.2.1 Untersuchung *in-vivo* Mausmodell 30
2.2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen 30
2.2.1.2 Experimentelle Gruppen und zeitlicher Ablauf 30
2.2.1.3 18R-HEPE-Behandlung mit 2 µg subcutan pro Mausgruppe im festgelegten Zeitintervall 31
2.2.1.4 Intratracheale Applikation von LPS 31
2.2.1.5 Anästhesie und Tötung 32
2.2.1.6 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) 32
2.2.1.7 Lungenentnahme 33
2.2.1.8 Leukozytenzählung 33
2.2.2 Durchflusszytometrie (*Fluorescence activated cell sorting,* FACS) 34
2.2.2.1 Markierung von Oberflächenantigenen mit Hilfe monoklonaler Antikörper 34
2.2.2.2 Prinzip der FACS-Analyse 35
2.2.2.3 Kompensation und Messung am FACS-Gerät 37
2.2.2.4 Auswertung der FACS-Ergebnisse 38
2.2.3 Statistische Analyse 38

3 Ergebnisse 38
3.1 LPS-stimulierte Leukozytenrekrutierung im Mausmodell 38
3.1.1 Gesamtzahl der Leukozyten im Lungenhomogenat nach LPS- und 18R-HEPE-Injektion 39
3.1.2 Effekt der LPS- und 18R-HEPE-Behandlung auf die einzelnen leukozytären Subpopulationen im Lungenhomogenat 40
3.1.2.1 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) im Lungenhomogenat 41
3.1.2.2 Monozyten und Makrophagen im Lungenhomogenat 42
3.1.2.3 Lymphozyten im Lungenhomogenat 43
3.1.2.4 Vergleich der Verteilungsmuster der leukozytären Subpopulationen im Lungenhomogenat im Zeitverlauf nach LPS-und 18R-HEPE-Behandlung 46
3.1.3 Gesamtzahl der Leukozyten in der BAL nach LPS- und

18R-HEPE-Behandlung 49
3.1.4 Auswirkung von LPS und 18R-HEPE auf die verschiedenen leukozytären Subpopulationen in der BAL 50
3.1.4.1 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) 50
3.1.4.2 Monozyten/Makrophagen (M/M) 51
3.1.4.3 Lymphozyten 52
3.1.5 Vergleich der Verteilungsmuster der leukozytären Subpopulationen in der BAL im Zeitverlauf nach LPS- und 18RHEPE-Behandlung 56
3.2 Apoptose und Nekrose in der BAL 59
3.3 Apoptose und Nekrose bei polymorphkernigen Granulozyten 59
3.3.1.1 Apoptose bei den PMN 59
3.3.1.2 Nekrose bei den PMN 62
3.3.2 Apoptose und Nekrose bei Monozyten und Makrophagen in der BAL 65
3.3.2.1 Apoptose bei Monozyten und Makrophagen 65
3.3.2.2 Nekrose bei den Monozyten/Makrophagen in der BAL 67

4 Diskussion 70
4.1 Pulmonale Applikation von LPS als Tiermodell für Studien zu infektiösen Lungenerkrankungen 70
4.2 Die Leukozytenverteilung in der Lunge von LPS-unbehandelten Wildtyp- und ChemR23-KO-Mäusen unterscheidet sich 71
4.3 Die Abwesenheit des ChemR23 Rezeptors beeinflusst die Rekrutierung von Makrophagen, Lymphozyten und PMNs nach LPS-Behandlung 72
4.4 Die Resolvin E1-Vorstufe 18R-HEPE wirkt sich auf die Entzündungsresolution in der Lunge von Wildtyp- und ChemR23-KO-Mäusen unterschiedlich aus 76
4.5 Apoptose und Nekrose von PMN und Makrophagen werden durch 18R-HEPE verstärkt 79
4.6 Therapeutischer Ausblick 80

5 Zusammenfassung 82

6 Summary 84

7 Bibliographie 85

7.1 Wissenschaftliche Artikel 85
7.2 Doktorarbeiten 98

8 Ehrenwörtliche Erklärung 99

9 Danksagung 100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: LPS induzierte Signaltransduktion..... 8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Leukozytenmigration aus der Kapillare durch das Endothel10
Abbildung 3: Die Resolvin E1 Vorstufe 18R-HEPE, Resolvin E1 und sein Rezeptor ChemR23 15
Abbildung 4: Strukturformel Arachidonsäure (AA) 18
Abbildung 5: Strukturformel Eicosapentaensäure (EPA) 20
Abbildung 6: Strukturformel Docosahexansäure (DHA)..... 20
Abbildung 7: Metabolisierung von Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA). 21
Abbildung 8: Zeitliche Ablauf der Versuche mit LPS Instillation und 18R-HEPE Injektion..... 31
Abbildung 9: Typisierung von ungefärbten Zellen anhand der Lichtstreuung (Dot Plot) 36
Abbildung 10: Beispielhafte Darstellung von gefärbten Zellen nach der FACS-Messung..... 37
Abbildung 11: Gesamt-Leukozyten, PMN, Makrophagen/Monozyten und Lymphozyten nach LPS Stimulation im Lungenhomogenat..... 45
Abbildung 12: Verteilungsmuster der leukozytären Populationen in der Lunge 48
Abbildung 13: Differentialzellbild der Leukozyten in Mio/ml in der BAL 55
Abbildung 14: Verteilungsmuster der leukozytären Subpopulationen in der BAL im Zeitverlauf nach LPS und 18R-HEPE (Abk: HEPE) Behandlung in Fraktionen in 100% 58
Abbildung 15: Apoptose der polymorphkernigen Granulozyten (PMN) in Mio/ml BAL..... 61
Abbildung 16: Nekrose der polymorphkernigen Granulozyten (PMN) in Mio/ml BAL..... 63
Abbildung 17: Verteilungsmuster apoptotischer, nekrotischer und vitaler PMN in der BAL im Zeitverlauf nach LPS und 18R- HEPE (Abk: HEPE) Behandlung in Fraktionen in 100%..... 64
Abbildung 18: Apoptose der Makrophagen/Monozyten (M/M) in Mio/ml BAL 66
Abbildung 19: Nekrose der Makrophagen/Monozyten (M/M) in Mio/ml BAL 68
Abbildung 20: Verteilungsmuster apoptotischer, nekrotischer und vitaler M/M in der BAL im Zeitverlauf nach LPS und 18R-HEPE Behandlung in Fraktionen in 100% 69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:LPS Stimulationsgruppen: 10 µg LPS intratracheale Instillation..... 30
Tabelle 2: Protokoll extrazelluläre Antikörperfärbungen der BAL und der Lunge 34
Tabelle 3: Protokoll intrazelluläre Antikörperfärbungen in der BAL 34
Tabelle 4: Antikörper-Cocktail für BAL..... 35
Tabelle 5: Antikörper-Cocktail für Lunge 35

1 Einleitung

1.1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau der Lunge

Die Lunge besteht aus zwei Lungenflügeln, die sich wiederum in Lungenlappen und funktionelle Segmente einteilen lassen können. Nach Funktion wird in ein luftleitendes Bronchial- und einem gasaustauschenden Alveolarsystem unterschieden. Der Bronchialbaum verzweigt sich ab der *Bifurcatio tracheae* dichotom in mehrere Segmentbronchien. Der gasaustauschende Abschnitt beginnt mit den *Bronchioli respiatorii* und endet in den Alveolargang, der traubenförmig von einer Vielzahl von Lungenbläschen umgeben ist. Die Alveolen sind durch Interalveolarsepten voneinander getrennt, die elastische Fasern und Kapillaren enthalten (alveolo-kapilläre Einheit). Bei der Blutversorgung der Lunge wird zwischen den Lungenarterien und den Bronchialarterien unterschieden. Die Lungenarterien führen sauerstoffarmes Blut aus dem Herzen, das in der Lunge oxygeniert wird, während die Bronchialarterien für die organeigene Sauerstoffversorgung notwendig sind. Analog dazu lässt sich das venöse System der Lunge in Lungenvenen und Bronchialvenen einteilen. Die nervale Innervation erfolgt zum einen über den Parasympathikus (v. a. Bronchokonstriktion und Sekretproduktion) und dem Sympathikus (Bronchodilatation).

Die essenzielle Funktion der Lunge ist die Oxygenierung des Blutes und die Abgabe von Kohlendioxid ($C0_2$) über die Atemluft. Über die Lungenarterien wird sauerstoffarmes Blut in die Kapillaren transportiert, die sich den Alveolen anlagern. Die Lungenbläschen bilden eine Gesamtoberfläche von ca. 140 m^2 und verfügen über eine dünne einschichtige Wand (sog. Blut-Luft-Schranke), wodurch sie dank kurzer Diffusionsstrecke einen optimalen Gasaustausch ermöglichen. Diese Blut-Luft-Schranke wird neben dem Kapillarendothel und der Basallamina überwiegend aus Pneumozyten Typ 1 aufgebaut, die untereinander durch *Tight Junctions* verbunden sind. Die Verteilung der Atemluft (Ventilation) wird dabei auf die Durchblutung (Perfusion) der Lungengefäße abgestimmt, damit der Gasaustausch gleichmäßig stattfindet. Von den Kapillaren aus strömt das sauerstoffangereicherte Blut über die Lungenvenen zum Herzen.

Um diese Diffusionsfläche aufrechtzuerhalten, produzieren die Pneumozyten Typ 2 den Surfactant. Dieses aus Lipiden, Proteinen und Calziumionen zusammengesetzte Sekret wird physiologischerweise auf das alveoläre Epithel sezerniert und dient der Aufrechterhaltung der geringen Oberflächenspannung. Ohne diese oberflächenaktive

Substanz wäre die Atmung um ein Vielfaches erschwert und die Lungenbläschen würden zusammenfallen (Atelektasen).

Da es bei der Inspiration zu dem Eindringen von Staubpartikeln, Bakterien oder Viren kommen kann, besitzt die Lunge verschiedene Abwehrmöglichkeiten. Dazu gehören Reflexe wie Husten und Niesen, das Abfangen und der Abtransport von Partikeln durch das schleimbedeckte respiratorische Flimmerepithel (*mukociliäre Clearance*), aber auch Komponenten der unspezifischen und spezifischen zellulären Immunabwehr. Als wichtige Immunabwehrzellen befinden sich neben den Pneumozyten große Alveolarmakrophagen, die in der Lage sind, Mikroorgansimen und Schwebstoffe zu phagozytieren und für die Aufrechterhaltung der Immunabwehr von besonderer Bedeutung sind. Zusätzlich zu den Makrophagen erfolgt bei Entzündungsprozessen eine Transmigration weiterer Zellen der Immunabwehr wie Lymphozyten und Granulozyten in das Lungenparenchym. Diese vermitteln hier eine spezifische Immunantwort.

1.2 Entstehungsprozesse von Entzündungsreaktionen in der Lunge, die zu einem akuten Lungenversagen führen können

1.2.1 Definition des akuten Lungenversagens

Das akute Lungenversagen ist ein lebensbedrohliches Syndrom, das sich im Zuge massiver, progressiver Schädigung des Lungengewebes zu einer hyperkapnischen respiratorischen Insuffizienz (früher respiratorische Globalinsuffizienz) entwickeln kann. Das akute Lungenversagen wurde 2012 von mehreren internationalen Fachgesellschaften *(European Society of Intensive Care Medicine, die American Thoracic Society und die Society of Critical Care Medicine)* in der sogenannten „Berlin-Definition“ neu definiert als eine akute respiratorische Insuffizienz (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS), die innerhalb einer Woche auftritt oder als Neuereignis zu werten ist.

Nach Angaben von Ware und Matthay sei die Letalitätsrate bei dieser Erkrankung besonders hoch und läge bei 40 bis 50% (1). Nach Esteban *et al.* lag die Inzidenz 2002 in Deutschland bei ca. 3,5-4,5 pro 100.000 Einwohnern (2). Aufgrund der unspezifischen Definitionskriterien variieren epidemiologische Angaben zum Teil erheblich. So beschrieben Dembinski *et al.* in einem Review von 2018 eine Inzidenz zwischen 4 und

79 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr, während die Letalität etwa zwischen 40 und 60% läge (3).

1.2.2 Ätiologie und Klinik des akuten Lungenversagens

Die auslösenden Faktoren, die zu einem ARDS führen können, sind mannigfaltig und werden in primär pulmonale und sekundär systemische Ursachen eingeteilt. Ihnen unterliegt immer ein fortschreitender Entzündungsprozess. Zu einer direkten Lungenschädigung kann es im Rahmen von Infektionen (Pneumonien), Inhalationstraumen (toxische Gase), Aspirationen (Magensäure), Lungenkontusionen und Fettembolien kommen. Systemische Ursachen können unter anderem ein septisches Geschehen, Polytraumen, akute Pankreatitis, Verbrennungen und gegebenenfalls auch medikamentöse Nebenwirkungen darstellen. Das Fortschreiten der Erkrankung verläuft phasenhaft und ist unabhängig davon, ob die ihr zugrunde liegende Entzündungsreaktion primär pulmonal oder systemisch bedingt ist.
Im Verlauf der Erkrankung, leiden ARDS-Patienten an einer progredienten arteriellen Oxygenierungsstörung (Hypoxämie) bei einem bestehenden intrapulmonalen Rechts-Links-Shunt (Perfusion ohne Ventilation). Physiologisch kommt es zu einer kompensatorischen Hyperventilation mit resultierender respiratorischer Alkalose. Die hypoxische Vasokonstriktion, der sogenannte Euler-Liljestrand-Effekt, der eine Hypoxämie verhindern soll, ist nach Aussagen von Walmrath *et al.* im ARDS gestört (4). Aufgrund eines durch die Entzündung entstehenden Lungenödems kommt es bei den Patienten zur Dyspnoe und letztlich zu einer respiratorischen Insuffizienz mit Hyperkapnie.
Das ARDS wird in der neuen Definition abhängig von dem Ausmaß der Hypoxämie in drei Schweregrade unterteilt. Hierbei wird ein reduzierter Quotient (der sog. Horovitz Quotient) aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischem Sauerstoffkonzentration (PaO_2/FiO_2) als diagnostisches Hilfsmittel genutzt. Die Schweregradeinteilung erfolgt in Abhängigkeit vom PaO_2/FiO_2 Quotienten in mild, moderat oder schwer (5). Diagnostisch wird das ARDS durch radiologischen Nachweis von bilateralen diffusen Infiltraten im Röntgen Thorax definiert, die nicht durch Pleuraergüsse, Atelektasen oder maligne Veränderungen zu erklären sind. Des Weiteren darf differenzialdiagnostisch die sich manifestierende respiratorische Insuffizienz nicht auf eine kardiale Ursache oder Hypervolämie zurückzuführen sein. Die Therapie des

ARDS beruht in erster Linie auf der Beseitigung der zugrundeliegenden Ursache und auf supportiver Therapie mit Stabilisierung des Patienten mittels lungenprotektiven Beatmung.

1.2.3 Pathophysiologie des akuten Lungenversagens

Im Krankheitsverlauf des ARDS kommt es durch entzündliche Prozesse zu einer phasenhaften massiven Störung der alveolo-kapillären Einheit, die zu Perfusions-, Permeabilitäts- und Gerinnungsstörungen führt. Der Entzündungsprozess wird dadurch eingeleitet, dass es innerhalb des Alveolarepithels durch die intravasal aktivierten Leukozyten und den ortsgebundenen Endothelzellen zur Produktion und Freisetzung von Sauerstoffradikalen, proteolytischen Enzymen und proinflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen (TNF-α), Interleukinen (wie beispielsweise IL-6) und von der Arachidonsäure abgeleiteten Eicosanoiden (Leukotriene, Prostaglandine) kommt. Über diese Signalbotenstoffe werden die entzündungsfördernden Prozesse in der Lunge maßgeblich vorangetrieben, und es kommt zu einer erhöhten Endothelpermeabilität mit Einstrom eines leukozytären Entzündungsinfiltrats in das Lungeninterstitium. Die Folge ist die Ausbildung eines interstitiellen-alveolären Lungenödems mit zunehmender Verminderung der Dehnbarkeit der Lunge. Das geschädigte Alveolarepithel, gekennzeichnet von der Destruktion der Pneumozyten Typ I und II, begünstigt zudem den Durchtritt von Erregern und Toxinen sowie die progressive Entzündungsreaktion noch weiter. Nach Hecker *et al.* führe das zu einer zunehmenden Hypoxämie und gestörter Surfactantsynthese mit der Gefahr eines alveolaren Kollapses und der Ausbildung von Atelektasen und hyalinen Membranen. Durch die endotheliale Schädigung und die Aktivierung der Endothelzellen käme es zudem zur Mikrothrombosierung und Vasokonstriktion, die letztlich zur Obstruktion der kapillären Strombahn führe (6).

Die oben genannten Prozesse seien letztlich verantwortlich für ein Missverhältnis zwischen Perfusion und Ventilation (*V/Q-mismatch*) mit Etablierung eines intrapulmonalen Shuntflusses (Perfusion ohne Ventilation) sowie einer Totraumventilation (Ventilation ohne Perfusion) (6).

Das ARDS kann sich nach dieser ersten akuten Phase vollständig zurückbilden. Durch aktive und passive Transportvorgänge kommt es zur Regredienz des alveolären Ödems und zur Restitution der Alveolarstruktur durch Umwandlung der Pneumozyten Typ II zu

Typ I Zellen. Regulatorische T-Lymphozyten und antiinflammatorische Resolvine (Eicosanoidderivate der Ω-3-Fettsäuren) beenden die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen und beseitigen apoptotische und nekrotische Zellen (6–13). Falls es allerdings nicht zu einer Resolution (Auflösung) der Entzündungsreaktion durch die beschriebenen Reparationsvorgänge kommt, kann ein progressiver Krankheitsverlauf eintreten, mit bindegewebiger Proliferation und einer irreversiblen pulmonalen Destruktion in Form von einer Lungenfibrose. Langfristig führt dies zu einer anhaltenden Hypoxämie, einer reduzierten Lungencompliance, einem vergrößerten Totraum sowie einer pulmonalen Hypertonie mit konsekutiver Rechtsherzbelastung (14–16).

1.2.4 Permeabilität der Lungenkapillaren und die Ausbildung eines Lungenödems

Das Lungenödem beschreibt die Ansammlung von Flüssigkeit in der Lunge. Es kann nach seiner Ursache in ein kardiogenes oder nicht kardiogenes Lungenödem eingeteilt werden. Dem kardiogenen Lungenödem liegt meistens eine reduzierte Pumpfunktion (z.B. Linkherzherzversagen) zugrunde, bei der es zum Rückstau des Blutes in die Lunge kommt. Das nicht-kardiogene Ödem tritt bei ARDS auf und wird durch eine Permeabilitätsstörung des Kapillarendothels im Rahmen von Entzündungsreaktionen beobachtet. Toxine und Medikamente, wie aber auch onkotische und hypoxische Ursachen, können ebenfalls die Entwicklung eines Lungenödems fördern.
Die Pathophysiologie des Lungenödems basiert auf einer Dysbalance zwischen Filtration aus dem Blutkreislauf und Reabsorption über die Lymphgefäße (17). Unter physiologischen Bedingungen wird dies über ein Netzwerk transvaskulärer Gradienten für kolloidosmotische und hydrostatische Drücke reguliert. Zudem stellt das Kapillarendothel eine regulierende Barriere für den Flüssigkeitsaustausch dar. Bei Störungen dieser Regulationsmechanismen kommt es zu einer Erhöhung der Flüssigkeitsfiltration bei gleichzeitiger reduzierter Resorption und konsekutiv zum proteinreichen Exsudat, das zum alveolären Lungenödem führen kann. Innerhalb der Alveolen führt diese Flüssigkeitsansammlung zu einer Verlängerung der Gas-Diffusionsstrecke, zu einem massiv gestörten Gasaustausch sowie zur Inaktivierung des von den Pneumozyten Typ II produzierten Surfactant (18). Durch den Surfactantmangel

kommt es zu einem massiven Alveolenkollaps und einer vaskulären Dysfunktion mit akuter Widerstandserhöhung in der pulmonalen Strombahn.
Dieser Pathomechanismus ist charakteristisch für das ARDS (19). Die vaskuläre Permeabiltitätserhöhung, die ödematös bedingte Oxygenierungsstörung und die übermäßige Ausschüttung der von der Arachidonsäure abgeleiteten Prostanoiden wie Prostazyklin (PGI_2) und Thromboxan A_2 (TxA_2) führen zu einem exazerbierten Entzündungsgeschehen. PGI_2 wirkt vasodilatativ und führt zur Verlangsamung des Blutflusses mit erleichtertem Übertritt von Zellen und Flüssigkeit in die Alveole (20). Neben der Ödembildung wirkt TxA_2 vasokonstriktiv auf die glatte Muskulatur. Dies führt zu einer pulmonalen Widerstandserhöhung. Über TxA_2 kommt es zudem zur Chemotaxis aktivierter Leukozyten zum Entzündungsherd (21).

1.3 Pulmonal-zelluläre Antwort auf Entzündungsstimuli beim ARDS

Im Rahmen von fortschreitenden, persistenten Entzündungsreaktionen (z. B. einer bakteriellen Pneumonie) kann es zu der beschriebenen akuten respiratorischen Lungenschädigung kommen. Durch komplexe Vorgänge werden Leukozyten (vor allem neutrophile Granulozyten) und Endothelzellen aktiviert. Es kommt zur Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen, wie auch antiinflammatorischen Zytokinen und Lipidmediatoren, die eine Schlüsselfunktion in der Auslösung und Auflösung (Resolution) der Entzündungsreaktion einnehmen und in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

1.3.1 LPS vermittelte Signaltransduktion

In der Lunge wirken speziell die Alveolarmakrophagen, die inhaliertes oder örtlich freigesetztes Material phagozytieren, als initiale Aktivatoren der sogenannten Lipopolysaccharid (LPS)-Entzündungskaskade (22,23). So würden nach Tonks *et al.* Makrophagen bei einer bakteriellen Pneumonie große Mengen an LPS aus den phagozytierten bakteriellen Zellwänden freisetzen und über den monozytären Signaltransduktionsweg eine ausgeprägte Entzündungsreaktion induzieren. Im Zusammenspiel mit der entzündungsbedingten erhöhten Gefäßpermeabilität fördere diese die Bildung eines alveolären Ödems, welches das Erkrankungsbild des ARDS kennzeichne (22,23).

Lipopolysaccharide (LPS) sind Verbindungen aus Fett- und Zucker-Bestandteilen (Polysacchariden) und bilden einen Teil der komplexen äußeren Membran gramnegativer Bakterien. LPS ist ein amphiphiles Polymer, das in drei Bereiche unterteilt werden kann: 1) das Lipid A stellt den lipophilen Anteil dar. Es besteht aus zwei bis drei Zuckerresten, an denen bis zu sechs Fettsäuren geknüpft sind, 2) das Kernoligosaccharid (*Core oligosaccharide*) besteht aus einem relativ konstanten Zuckerrest (z.B. Heptose), 3) die sich daran anschließende O-spezifische Kette (*O-antigen*) ist im höchsten Maße variabel und besteht aus nur wenigen Zuckern, allerdings aus bis zu vierzig sich wiederholenden Einheiten. Sie bedingt die serologische Spezifität der Bakterien.

Die endotoxische Eigenschaft von LPS ist auf das Lipid A zurückzuführen, durch das das Polysaccharid in der bakteriellen Membran verankert ist. Geht ein gramnegatives Bakterium zugrunde, wird LPS freigesetzt und kann in die Blutstrombahn gelangen. Dort kann es von dem in der Leber produzierten Serumprotein Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP) gebunden werden. Die Bindung an LBP erhöht die LPS Affinität zu dem leukozytären Membranrezeptor CD14 (*Cluster of differentiation*) und löst durch die Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden eine immunologische Reaktion aus (24,25) (Abbildung 1).

CD14 ist überwiegend als membrangebundener Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) auf der Zelloberfläche von Makrophagen, mononukleären Zellen und neutrophilen Granulozyten zu finden (mCD14) (26,27). Zudem existiert eine lösliche CD14 Form (sCD14), die von Hepatozyten und Monozyten freigesetzt wird. Diese lösliche Form des Rezeptors ermöglicht Zellen, die kein CD14 exprimieren, wie zum Beispiel Endothelzellen, LPS zu binden.

Nach Aktivierung von mCD14 durch den LPS/LBP Komplex kommt es zur Bindung mit dem Toll-like Rezeptor-4 (TLR4) (28,29). Der TLR4, ein Transmembranprotein, ist der entscheidende Hauptrezeptor für die durch LPS ausgelösten Effekte (16). An diesen Rezeptor bindet der LPS-LBP/mCD14-Komplex und induziert die weitere Signaltransduktion. Über MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) werden weitere Kinasen (IRAK, TRAF-6, TAK 1, IKK) aktiviert, die letztlich zur Phosphorylierung des Inhibitor Komplexes Iκβ-NFκβ (*nukleärer Transkriptionsfaktor κβ,* Iκβ, und *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer,* NFκβ) führen und damit die Freisetzung des proinflammatorisch wirkenden Spaltproduktes NFκβ aktivieren. NFκβ wird aus dem Zytosol in den Zellkern transloziert, wo es an die DNA-

Erkennungssequenzen von Zielgenen, etwa die von Zytokinen (Chemokine, Tumornekrosefaktor α, Interleukin 1β/8), bindet und deren Transkription einleitet (29–31) (Abbildung 1).

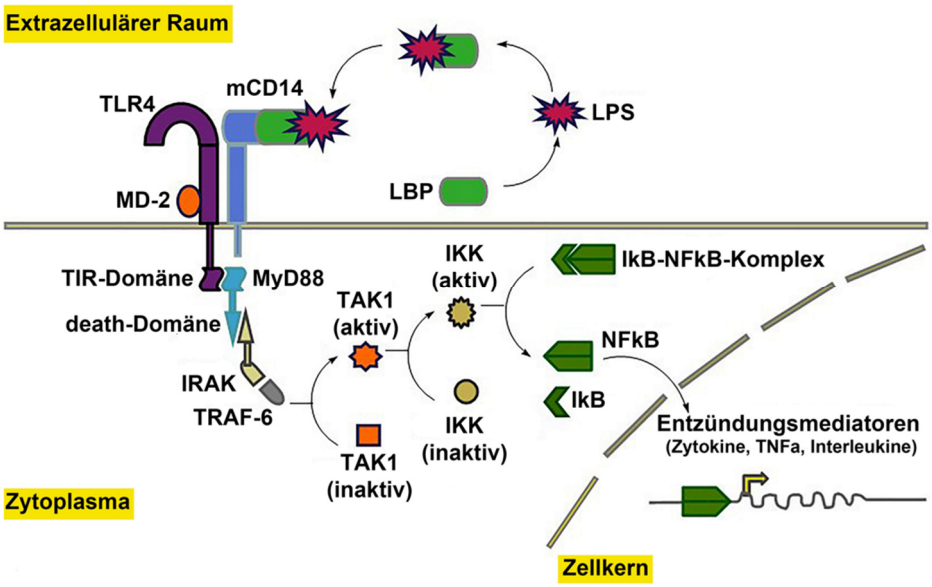

Abbildung 1: LPS induzierte Signaltransduktion

LPS und LBP bilden zusammen einen Komplex. Dieser koppelt an mCD 14, den Rezeptor für bakterielles Endotoxin. Zusammen interagieren sie mit dem TLR 4. Die Signaltransduktion führt über MyD 88, IRAK und TRAF 6 zur Phosphorylierung von IκB und somit zur Aktivierung von NF- κB. Dieser transloziert in den Zellkern und löst dort die Synthese von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren aus (modifiziert nach (32)).

1.3.2 Proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine und Lipidmediatoren

Nach der Interaktion mit LPS werden die Effektorzellen wie polymorphkernige Granulozyten (PMN), Monozyten, Makrophagen oder auch Gewebszellen (z. B. Endothelzellen) aktiviert und produzieren daraufhin Zytokine. Zytokine sind niedermolekulare Glykopeptidverbindungen mit autokriner oder parakriner Wirkung. Sie entfalten ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen. Das Zytokinsignal wird über eine Signaltransduktionskaskade in das Zellinnere weitergeleitet und führt zu einer Anpassung der Genexpression. Diese vermittelt

wiederum verschiedene zelluläre Antworten wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Zellmigration oder Degranulation. Zytokine werden in fünf Hauptgruppen eingeteilt: Chemokine, Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren und koloniestimulierende Faktoren.

Chemokine sind kleine Signalproteine, die über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, unter anderem den Chemerin Rezeptor 23 (*chemokine like receptor 1, CMKLR1*), ihre Wirkung ausüben und neben der Chemotaxis von Leukozyten auch aktivierende Effekte haben (33).

Zytokine wie der Tumornekrosefaktor α (TNF-α) und die Interleukine (IL) spielen als Mediatoren innerhalb von Entzündungsprozessen eine besondere Rolle (34). TNF-α nimmt hier eine wichtige Schlüsselfunktion ein, da es die Synthese weiterer proinflammatorisch wirkenden Zytokine (IL-1β, IL-6) initiert und somit die inflammatorische Immunantwort aufrechterhält.

Neben proinflammatorischen werden zeitgleich auch antiinflammatorische Mediatoren (z.B. IL-4, IL-10 und IL-13) synthetisiert. Diese unterdrücken die Gensynthese und die damit verbundene Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus den Leukozyten (35) und sind dadurch an der Eindämmung der Entzündung maßgeblich mitbeteiligt.

Neben Zytokinen werden über die in den Zellmembranen befindlichen Ω-6 und Ω-3 Fettsäuren weitere immunregulierende Signalstoffe gebildet, die sogenannten Lipidmediatoren. Diese Lipidmediatoren können entweder proinflammatorische als auch antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen. Die von der Ω-6 Fettsäure Arachidonsäure abgeleiteten Eicosanoide (etwa Prostazyklin, Thromboxan) weisen einen überwiegend entzündungsfördernden Effekt auf. Die Lipidmediatoren der Ω-3 Fettsäuren Eicosapentaensäure, Docosahexaensäure (EPA, DHA) (unter anderem Resolvine) zeigen überwiegend antiinflammatorische und entzündungsauflösende Charakteristika. Insbesondere die Resolvine sind in der derzeitigen wissenschaftlichen Forschung von großem Interesse. So konnte in mehreren experimentellen Studien belegt werden, dass durch die Gabe von Ω-3 Fettsäuren die Schwere des Krankheitsbildes von ARDS gesenkt werden konnte (8–10,36). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die antiinflammatorischen Effekte des Eicosapentaensäure (EPA)-Derivats Resolvin E1 unter Verwendung seiner Vorstufe (*Prodrug*) 18R-Hydroxyeikosapentaensäure (18R-HEPE) genauer untersucht und beschrieben werden.

1.3.3 Wirkung von Chemokinen bei der entzündungsbedingten, endothelialen Transmigration von Leukozyten

Leukozyten sind korpuskuläre Bestandteil des Immunsystems. Sie können in unterschiedliche Subtypen unterteilt werden: unter anderem Granulozyten, Makrophagen /Monozyten und Lymphozyten. Durch die LPS-vermittelte Signaltransduktion spielen Leukozyten während des Entzündungsprozesses eine entscheidende Rolle, indem sie proinflammatorische Mediatoren wie Chemokine und andere Zytokine produzieren und freisetzen. Die Freisetzung dieser Stoffe hat unter anderem eine Zelltransmigration zur Folge. Die Immunzellen migrieren vom Intravasalraum (Kapillare) in das umliegende entzündete Gewebe (Interstitium), um dort bei Entzündungsreaktionen ihre antimikrobiellen Effektorfunktionen auszuüben. Dieser Prozess wird auch als „chemokinvermittelte Chemotaxis“ bezeichnet. Die Leukozyten bewegen sich unter Ausbildung von Pseudopodien (dynamische zytoplasmatische Membranausstülpungen) amöboid zum Punkt der höchsten Chemokinkonzentration.
Am Entzündungsort erfolgt anschließend die Transmigration dreiphasig durch das Kapillarendothel (37) (Abbildung 2).

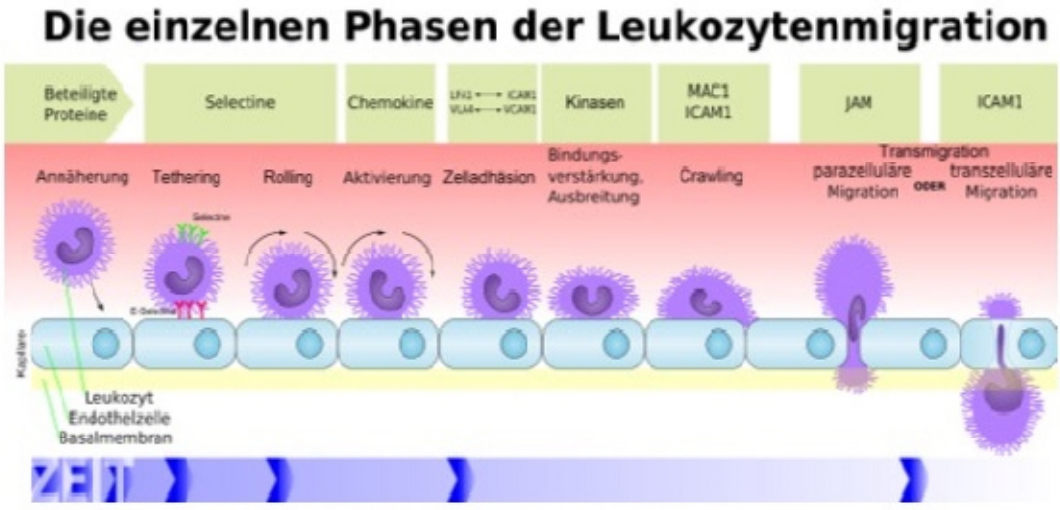

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Leukozytenmigration aus der Kapillare durch das Endothel

Dargestellt ist die Transmigration der Leukozyten aus der Kapillare über die Endothelzelle ins Gewebe. Die Leukozyten treten mit aktivierten Endothelzellen in Kontakt. Anfänglich kommt es zum Selektin-abhängigen Rollen, später zur Chemokin-vermittelten Verstärkung der Integrin- Affinität und zur stabilen

Integrin-vermittelten Adhäsion an das Endothel. Schließlich kommt es zur Transmigration der Leukozyten durch das Endothel in das darunter liegende Gewebe (Modifiziert nach Ley *et al.,* 2000).

Phase 1. *Tethering* und *Rolling* am Gefäßendothel

Die Transmigration der Leukozyten findet überwiegend an den Kapillaren statt (38). Die erste Interaktion zwischen den weißen Blutkörperchen und dem Gefäßendothel, dem sogenannten *Tethering*, führt zu einer lockeren Bindung. Hierbei kommt es durch den Blutfluss zu einer scherkraftbedingten Verflachung/Verformung der Leukozyten und dadurch zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche zum Endothel. Die Leukozyten werden in ihrer Geschwindigkeit gedrosselt und „rollen" über die Endothelfläche *(Rolling).* Diese ersten initialen Berührungsprozesse werden über Zytokin-induzierte Expression von unterschiedlichen Adhäsionsmolekülen (Selektine) und ihren entsprechenden Liganden vermittelt. L-(Leukozyten) Selektin wird konstitutiv auf den Leukozyten exprimiert. E-(Endothel) und P-(Plättchen und Endothel) Selektine werden u. a. durch proinflammatorische Mediatoren wie TNF-α und Interleukin 1 (IL-1) auf der Oberfläche der Plättchen oder Endothelzellen exprimiert (37).

Phase 2. Leukozytenaktivierung und *Arrest*

Während der Entzündungsreaktion werden von Zytokin-aktivierten Leukozyten (vor allem neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen) Chemokine produziert (39). Diese chemotaktischen Zytokine wirken über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und führen zur Expression von Integrinen auf der Zelloberfläche der Immunzellen. Integrine sind Transmembranproteine, die in allen tierischen Zellen, ausgenommen von Erythrozyten, vorkommen und konstitutiv in der Zellmembran verankert sind. Sie dienen der Zelladhäsion, indem sie an Liganden der Immunglobulin-Superfamilie wie dem ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) oder VCAM-1 (*vascular cell-adhesion molecule 1*) auf Endothelzellen binden. Ein bedeutsames Integrin für die Adhäsion an dem Endothel Liganden ICAM-1 ist das β-2-Integrin LFA-1 (Leukozyten-Funktions-assoziiertes Antigen-1) der neutrophilen Granulozyten.

Kommt es zu einer Chemokin-GPCR Bindung, verändert sich die Konformation der leukozytären Integrine und die Bindungsaffinität zum endothelialen Liganden wird

erhöht (40). Es resultiert eine Verlangsamung des Rolling–Effektes mit dem daraus folgenden Stillstand (*Arrest*) und einer festen Leukozyt-Endothel Adhäsion.

Phase 3. *Intravascular Crawling und Transmigration*

Nicht jeder endotheliale Adhäsionsort ist für eine optimale Transmigration geeignet (41,42). Die Leukozyten „kriechen" (*crawling*) entlang des Kapillargefäßes zu einem günstigeren Eintrittspunkt. Dieser Crawling-Prozess wird u. a. durch das β-2-Integrin, Mac-1 (*Macrophagen-1 Antigen*) und dem dazugehörigen Liganden ICAM-1 vermittelt. Die Transmigration der Leukozyten (Leukodiapedese) kann letztlich auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen parazellulär, das heißt zwischen benachbarten Endothelzellen *(junctional),* als auch transzellulär *(nonjunctional)* durch die Zelle hindurch (43). Für die parazelluläre Leukodiapedese sind insbesondere die endothelialen Adhäsionsmoleküle PECAM-1 *(platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1)*, CD99 und andere JAMs *(junctional adhesion molecules)* von Bedeutung (43). Im Gegensatz dazu steht die ICAM-1 vermittelte Leukodiapedese, die nur bei einem kleinen Anteil der migrierenden Leukozyten vorkommt. Diese erfolgt üblicherweise an Orten, an denen die endotheliale Kapillarschicht besonders dünn ist und daher nur einen kurzen Weg in Anspruch nimmt (44). Durch apikale Membraneinstülpungen (*Caveolae*) gelangen die Immunzellen letztlich durch einen intrazellulären Kanal auf die endotheliale Basalseite (43). Auf ihrem Weg durch die Kapillarwand müssen die Zellen drei Strukturen überwinden, um an den Ort der Inflammation zu gelangen: die Endothelzelle, die Basalmembran und evtl. eine dünne Perizytenschicht. Die letzten beiden Migrationsschritte sind bislang noch nicht vollständig geklärt und sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass leukozytäre Proteasen (z. B. Elastase) hierfür verantwortlich sein könnten (43).

1.4 Pathophysiologischer Zusammenhang zwischen entzündungsbedingter endothelialer Transmigration, der Entstehung eines Lungenödems und der Etablierung von ARDS

Alveolarmakrophagen spielen in der Immunabwehr bei aerogen aufgenommenem Material eine entscheidende Rolle. Zusammen mit den alveolären Epithelzellen kommt es durch einen entzündlichen Reiz (z. B. LPS gramnegativer Bakterien) zu einer

komplexen Stimulation und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF-α, IL-1β, Chemokine u. a.) mit resultierender leukozytärer Aktivierung und Chemotaxis zum Entzündungsherd.
Aus der Zytokin-vermittelten Expression von Adhäsionsmolekülen (insbesondere VCAM-1 und ICAM-1) auf den Oberflächen von neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen folgt eine vermehrte Leukozytenrekrutierung und -transmigration ins extravasale Lungenkompartiment (35). Im Rahmen des respiratorischen Entzündungsgeschehens bei erhöhter Zytokin- und Eicosanoidsynthese kommt es zur Störung der alveolo-kapillären Blut-Luft-Schranke und zur gesteigerten pulmonalvaskulären Permeabilität mit nachfolgender Entwicklung eines interstitiell-alveolären Ödems. Bei Fortschreiten der Entzündung, ohne ausreichende Resolutions- und Reparaturprozesse, kommt es zur deutlichen Reduktion der Surfactantproduktion mit Gefahr eines Alveolarkollaps mit Atelektasen und Zerstörung der Gasaustauschflächen. Die Folge ist eine akute respiratorische Insuffizienz (ARDS*).*

1.5 Die ChemR23-KO-Maus: Ein Modell für die Studie von Defekten der Chemokin-vermittelten Leukozytentransmigration und der Resolution entzündlicher Prozesse in der Lunge

1.5.1 Der Chemokin-Rezeptor 23 und seine Liganden Chemerin und Resolvin E1

Der Chemokin-Rezeptor 23 (ChemR23), in der Literatur auch *chemokine-like receptor 1* (CMKLR-1) genannt, ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Er wird hauptsächlich auf leukozytären Zellpopulationen wie Makrophagen, Mikroglia, natürlichen Killerzellen sowie anderen monozytären Zellen exprimiert. Auf B- und T-Lymphozyten, Granulozyten und Thrombozyten ist CMKLR-1 hingegen nicht vorhanden. Eine ChemR23-Expression wurde ebenfalls auf nicht-leukozytären Zellen wie Endothelzellen, Adipozyten, Hepatozyten und Myozyten beschrieben (45,46).
Chemerin ist ein Adipokin, das überwiegend im Fettgewebe, in der Leber sowie im Pankreas gebildet und ins Plasma ausgeschüttet wird (47–49). Es fungiert unter physiologischen Bedingungen als Adipozytendifferenzierungsfaktor (50), hat eine antibakterielle Wirksamkeit und wirkt chemotaktisch auf bestimmte

Leukozytenpopulationen (49). Chemerin bindet am ChemR23 und steuert *in vitro* die entzündungsherdgerichtete Migration von Makrophagen und dentritischen Zellen, was auf eine proinflammatorische Rolle hindeutet (51,52).

Allerdings kann dieses Adipokin auch antiinflammatorische Effekte bewirken. So konnte in einer Arbeit von Luangsay *et al*. gezeigt werden, dass die Applikation von Chemerin nach LPS-induzierter Lungenschädigung zur Abnahme der Inflammationsantwort führte, mit reduzierter extravasaler Migration von neutrophilen Granulozyten und einer gesteigerten Makrophagenanzahl. Beim LPS-behandelten ChemR23-KO-Mausmodell zeigte sich bei gleichzeitiger Chemerin-Applikation eine erhöhte Neutrophilentransmigration sowie eine verstärkte Chemokin- und Zytokinfreisetzung in die bronchoalveoläre Lavage (BAL). Eine Makrophagenreaktion konnte nicht beobachtet werden (53).

Ein weiterer ChemR23-Ligand ist das von Arita *et al.* beschriebene Resolvin E1 (RvE1). Es ist ein von der essenziellen Ω-3-Fettsäure Eicosapentaensäure (EPA) abgeleiteter antiinflammatorischer Lipidmediator, der dämpfend auf NFκβ wirkt und einen entzündungsauflösenden Effekt ausübt (33). In der Studie von Arita *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass RvE1 im nanomolaren Konzentrationsbereich Hautentzündungen, Peritonitis, die Migration von dendritischen Zellen (DC) und die Produktion von Interleukin 12 (IL-12) deutlich reduziert (33).

Die verschiedenen Liganden und deren unterschiedlichen Wirkungen legen nahe, dass ChemR23 ein multifunktioneller Rezeptor ist, der je nach Interaktion divergierende, bisher noch nicht ganz geklärte Signaltransduktionswege initialisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Interaktion zwischen ChemR23 und Resolvin E1, mit seiner Vorstufe 18R-Hydroxyeikosapentaensäure (18R-HEPE), in einer LPS-induzierten pulmonalen Entzündungsreaktion untersucht (Abbildung 3).

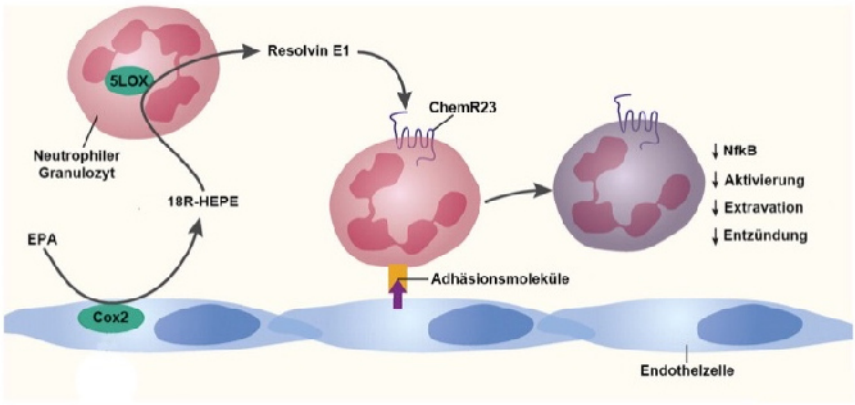

Abbildung 3: Die Resolvin E1 Vorstufe 18R-HEPE, Resolvin E1 und sein Chemokin-Rezeptor 23
Die transzelluläre Synthese von Resolvin E1 aus der Nahrung aufgenommenen Eicosapentaensäure (EPA) erfolgt innerhalb der Mikrozirkulation durch die abgestimmte Wirkung von Endothelzellen-COX-2 und Neutrophilen-5-Lipoxygenase (5-LOX) (Modifiziert nach (54)).

1.5.2 Resolvin-vermittelte Resolution inflammatorischer Prozesse

Entzündungsreaktionen sind koordinierte und aktive Prozesse, die es dem Körper ermöglichen, das eigene Gewebe zu schützen, schädliche Noxen wie Bakterien und Viren zu beseitigen und die Integrität und Funktion des Gewebes wiederherzustellen (55). Die Resolution, das heißt die Auflösung der Entzündung, wurde lange Zeit als ein rein passiver Prozess verstanden, bei dem proinflammatorische Mediatoren unwirksam gemacht werden und dadurch die Entzündung hemmen (56). Seit der Erforschung von Lipidmediatoren (u. a. Resolvine) wurde deutlich, dass die Auflösung einer akuten Entzündungsreaktion ebenfalls aktiv gesteuert wird (57).

Während einer Entzündungsreaktion migrieren zirkulierende neutrophile Granulozyten ins geschädigte Gewebe und stimulieren die Rekrutierung von Monozyten, um die Inflammation aufrechtzuerhalten (58). Unter physiologischen Bedingungen durchlaufen die Granulozyten, nachdem sie ihre entzündungsfördernde Funktion erfüllt haben, eine Apoptose (Zelltod) (59). Die funktionslosen Granulozyten werden daraufhin von Makrophagen phagozytiert, dies führt zu einem Wechsel von einem pro- zu einem antiinflammatorischen Makrophagentyp (60,61). Im Anschluss verlassen die Makrophagen den Entzündungsherd über die Lymphgefäße und es stellt sich eine Rückkehr zur Gewebehomöostase ein.

Beim nicht reversiblen ARDS ist dieser Resolutionsprozess gestört und die Gewebehomöostase bleibt aus. Die Folge ist die Exazerbation des Krankheitsbildes mit den bereits beschriebenen Symptomen.

1.6 Apoptose- und Nekroseprozesse im Rahmen einer Entzündungsreaktion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von 18R-HEPE auf apoptotische und nekrotische Prozesse nach intratrachealer LPS-Stimulation untersucht. Für die Auflösung eines Entzündungsgeschehens wie zum Beispiel beim ARDS ist die Phagozytose von apoptotischen und nekrotischen Zellen durch Makrophagen essenziell. Es dient zur Beseitigung von Zelldetritus und initiiert den Heilungsvorgang.
Die Apoptose ist der programmierte Zelltod einer Zelle. Hier sind einzelne Zellen betroffen und nicht wie bei der Nekrose ganze Zellverbände. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zur Nekrose ist, dass es zu keiner Entzündungsreaktion kommt.
Die Initialisierung der Apoptose kann über zwei Wege stattfinden, entweder über den extrinsischen (durch externe Reize) oder über den intrinsischen Weg (durch interne Stimuli). Beiden Wegen ist gemeinsam, dass über Stimuli Initiatorcaspasen aktiviert werden, die wiederum Effektorcasapsen aktivieren und so die Apoptose auslösen. Caspasen sind Cystein-Aspartat-spezifische-Proteasen, die proteolytische Eigenschaften besitzen und dadurch Zellmembranen, Zytoplasma und Zellkerne auflösen können.
Bei dem extrinsischen Weg werden über den sogenannten zellmembranständigen „Todesrezeptor“ (beispielsweise Fas-Rezeptor oder TNF-Rezeptor), extrazelluläre Liganden (u. a. TNF-α) gebunden, die ihrerseits zur Aktivierung von Initiatorcaspasen wie z. B. Caspase 8 führen. Daraufhin kommt es zur Signaltransduktion mit Aktivierung von Effektorcaspasen (z. B. Caspase 3) und der Einleitung der Apoptose.
Bei dem intrinsischen Weg wird über intrazelluläre Reize der mitochondriale Weg aktiviert. Durch DNA schädigende Noxen (Bestrahlung oder chemische Giftstoffe) wird das Protein p53 aktiviert. P53 aktiviert weitere proapoptotische Proteine (z. B. Bax oder Bad, zur Bcl-2-Familie gehörend), die die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran erhöhen und dadurch durchlässig für Cytochrom c machen. Im Zytosol bindet Cytochrom c an den apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (APAF-1). Dieser Komplex wandelt die Procaspase 9 in die aktive Form Caspase 9 um und aktiviert Effektorcaspasen.

Die gemeinsame Endstrecke der beiden apoptotischen Wege führt nach Aktivierung der Effektorcaspasen letztlich zur Schrumpfung des Zellkerns mit Kondensation des Chromatins. Es kommt zur Fragmentierung des Zellkerns, die einzelne Zelle löst sich aus dem Zellverband oder aus der Extrazellulärmatrix und zerfällt in apoptotische Teilchen. Die anschließende Phagozytose der Apoptosebläschen beendet durch Makrophagen den programmierten Zellsuizid.

Die Nekrose ist ein Sammelbegriff für irreversible Gewebsuntergänge und ist nicht physiologisch induziert. Sie geht immer mit einer Entzündungsreaktion einher und führt zur Zellschädigung mit Verlust von RNA. Hierbei kommt es zur Auflösung bzw. Zerfall des Zellkerns mit Schwellung und Zerstörung der Zellorganellen. Die Folge ist das Zerplatzen der Zelle und eine Entzündungsreaktion mit einem massiven Einstrom v. a. von neutrophilen Granulozyten ins Wundgebiet. Das nekrotische Gewebe wird im Anschluss von weiteren Leukozyten abgebaut.

1.7 Lipide und Lipidmediatoren

Lipide sind eine große und heterogene Gruppe von Stoffen, die wegen ihren langen Kohlenwasserstoffketten überwiegend hydrophob sind. Es gibt allerdings auch Lipide, die hydrophile Molekülstrukturen aufweisen und so besser mit wässrigen Lösungen interagieren können. Diese Lipide werden daher als amphiphil bezeichnet. Viele der amphiphilen Lipide kommen als Strukturkomponenten in Zellmembranen, als Signalmoleküle und als Energiespeicher in lebenden Organismen vor.

Fette können in sieben Gruppen eingeteilt werden: Fettsäuren, Triglyceride, Phospholipide, Sphingolipide, Isoprenoide, Lipopolysaccharide und Wachse.

Fettsäuren bestehen aus unterschiedlich langen Kohlenstoffketten und einer Carboxylgruppe. Sie werden in essenziell und nicht essenziell bzw. anhand ihrer chemischen Struktur in gesättigte und ungesättigte Fettsäuren eingeteilt. Die nicht essenziellen Fettsäuren können unabhängig von der Nahrungsaufnahme vom Organismus synthetisiert werden. Zu den essenziellen Fettsäuren, die vom Körper nicht selbstständig hergestellt werden können, gehören u. a. Linolsäure und Linolensäure. Aus diesen werden in weiteren Schritten die mehrfach ungesättigten Fettsäuren *(polyunsaturated fatty acids, PUFA)* Arachidonsäure (AA), Eicosapentaensäure (EPA) und die Docosahexaensäure (DHA) metabolisiert (Abbildungen 4-6).

Ungesättigte Fettsäuren besitzen Doppelbindungen und können durch Radikale (z. B. Sauerstoffatome) leicht oxidiert werden.
Eine entscheidende Rolle in der inflammatorischen Leukozytenregulation spielen die Oxygenierungsprodukte dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren die sogenannten Lipidmediatoren (62).

1.7.1 Ausbildung unterschiedlicher Lipidmediatoren durch die Verstoffwechslung von PUFAs

PUFAs sind Bestandteile der Zellmembran, die eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen spielen, in dem sie als Vorstufen von Lipidmediatoren dienen. Bei der Initiierung einer Entzündungsreaktion kommt es zur Hydrolyse von bestimmten PUFAs wie die Ω-6-Fettsäure AA und die Ω-3-Fettsäuren EPA und DHA aus den Phospholipiden der Zellmembran durch das Enzym Phospholipase A_2 (PLA_2). Im Gegensatz zu Ω-6 -Fettsäurederivaten wirken die der Ω-3-Fettsäure vergleichsweise entzündungshemmend (63). Nach Abspaltung aus der Zellmembran werden PUFAs über verschiedene Stoffwechselwege in weiteren Schritten zu bioaktiven Metaboliten (Eicosanoide) umgewandelt, die eine wesentliche Rolle in der Regulation der Inflammation und Zellproliferation spielen (64). Zu den Eicosanoiden gehören unter anderem Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene, Lipoxine, und Resolvine.
Die Arachidonsäure (AA) ist eine ungesättigte Fettsäure, bestehend aus 20 Kohlenstoffketten und vier Doppelbindungen und wird entweder über die Nahrung aufgenommen oder aus der essenziellen Ω -6-Fettsäure Linolsäure hergestellt.

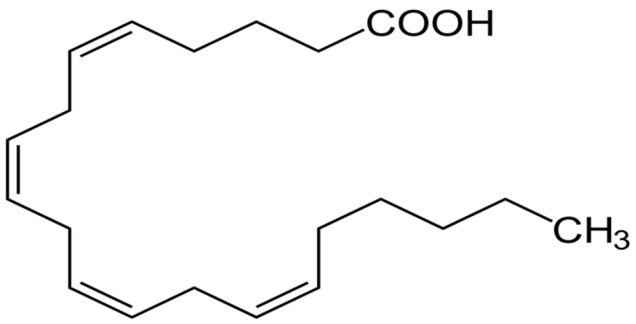

Abbildung 4: Strukturformel Arachidonsäure (AA)

Die Arachidonsäure kann über drei unterschiedliche enzymatische Reaktionen zu Eicosanoiden verstoffwechselt werden: a) Cyclooxygenase (COX) metabolisiert die AA zu Prostaglandinen (PG) und Thromboxane A_2 (TxA_2), b) Lipoxygenase (LOX) wandelt die AA in Leukotriene (LT) und Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE) um und c) Cytochrom P 450 (CYP) synthetisiert aus AA Epoxyeicosatriensäuren (EET).

Die Cyclooxygenasen (COX) sind im Zytosol vorkommende Enzyme und besitzen eine zentrale Funktion in der Regulation der Entzündungsreaktion, indem sie die Prostaglandinsynthese steuern. Es werden zwei Isoenzyme differenziert, COX-1 und COX-2, die sich im Austausch von Isoleucin gegen Valin an Position 523 unterscheiden. COX-1 wird in fast allen Zellen dauerhaft synthetisiert, wohingegen COX-2 meist erst nach Entzündungsstimulus exprimiert wird. Die COX bildet über eine Bis-Dioxygenierung der Arachidonsäure das Prostaglandin G_2 (PGG_2) und anschließend über eine Peroxidase das Prostaglandin H_2 (PGH_2) (65). Das Endoperoxid PGH_2 nimmt eine besondere Schlüsselrolle ein, da es für die weitere Prostaglandinsythese notwendig ist. In weiteren Metabolisierungsschritten werden mittels Prostaglandinsynthasen PGD_2, PGF_2-α, PGE_2, Prostazyklin (PGI_2) und Thromboxan (TxA_2) gebildet, die je nach Rezeptoraffinität unterschiedliche Effekte wie Vasokonstriktion, Vasodilatation und Bronchokonstriktion haben (66).

Zu Beginn des Lipoxygenase (LOX) Metabolismus erfolgt der katalysierte Einbau eines Sauerstoffmoleküls in die Arachidonsäure. Abhängig vom Standort des C-Atom, an dem der Sauerstoff eingebaut wird, unterscheidet man zwischen 5-, 12- und 15-Lipoxygenase und weiteren Isoenzymen. Je nach Zelltyp finden sich differente Enzymausstattungen. So besitzen Leukozyten und Makrophagen hauptsächlich 5- und 15-LOX, wohingegen Thrombozyten überwiegend 12-Lipoxygenase enthalten. 5-LOX benötigt zudem einen Stimulus, um seine Metaboliten herzustellen. Durch Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels oder durch Phosphorylierung kommt es über 5-LOX zur Synthese des instabilen Hydroperoxid 5-HPETE (5-Hydroxyperoxyeicosatetraensäure), das durch eine Hydroxyperoxidase in 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) umgewandelt werden kann. In einem weiteren Schritt entsteht aus 5-HPETE durch die LTA4-Synthetase das sehr instabile Zwischenprodukt Leukotrien A4 (LTA4). Weitere enzymatische Zwischenreaktionen metabolisieren LTA4 zu dem stark proinflammatorisch wirksamen Leukotrien B4 (LTB4) bzw. zu den cysteinylhaltigen Leukotrienen LTC4, LTD4 und LTE4 (67–70).

Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexansäure (DHA) gehören zu den Ω-3 Fettsäuren, weil ihre letzte Doppelbindung drei Kohlenstoffatome von der endständigen Methylgruppe entfernt liegt. EPA ist eine fünffach ungesättigte Fettsäure und besteht aus 20 Kohlenstoffatomen (C20:5 Ω-3). DHA ist eine sechsfach ungesättigte Fettsäure und besitzt insgesamt 22 Kohlenstoffatome (C22:6 Ω-3).

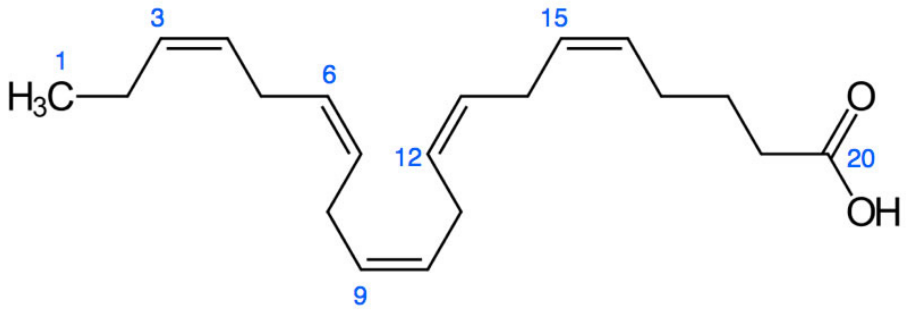

Abbildung 5: Strukturformel Eicosapentaensäure (EPA)

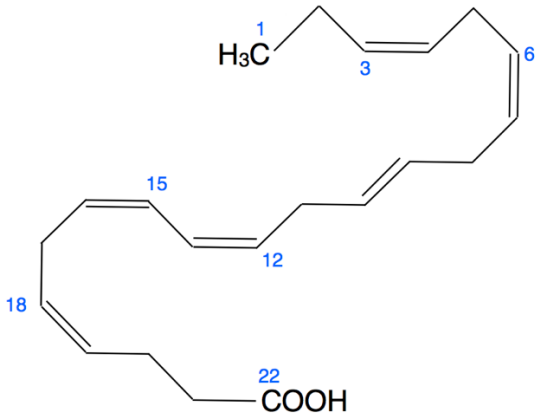

Abbildung 6: Strukturformel Docosahexansäure (DHA)

EPA und DHA kommen als Ω-3 Fettsäuren, im Gegensatz zu der Ω-6 Fettsäure Arachidonsäure, zu einem Großteil in Kaltwasserfischen und Meeresorganismen vor (71).

Beide ungesättigten Fettsäuren können zu Resolvinen der E und D Serie verstoffwechselt werden. Diese weisen im Gegensatz zu den Eicosanoiden der Arachidonsäure ein vergleichsweise antiinflammatorisches und entzündungsauflösendes Potential auf. Nach

der enzymatischen Freisetzung von EPA und DHA aus der Zellmembran durch PLA_2 werden beispielsweise über 15-LOX Lipidmediatoren der DHA (RvD1, RvD2, Protektine) und über COX-2, Cytochrom P450 und 5-LOX Resolvine der EPA (RvE1, RvE2) metabolisiert (72).

Neben der Synthese der Resolvine E1, E2 entstehen aufgrund ähnlich analoger enzymatischer Oxidationsschritte wie bei der AA bei der Verstoffwechselung von EPA auch andere schwach proinflammatorischen wirkende Eicosanoide, vor allem Prostaglandine (PG), Thromboxan (TX) und Leukotriene (LT) (Dissertation Ott, J.R., 2008).

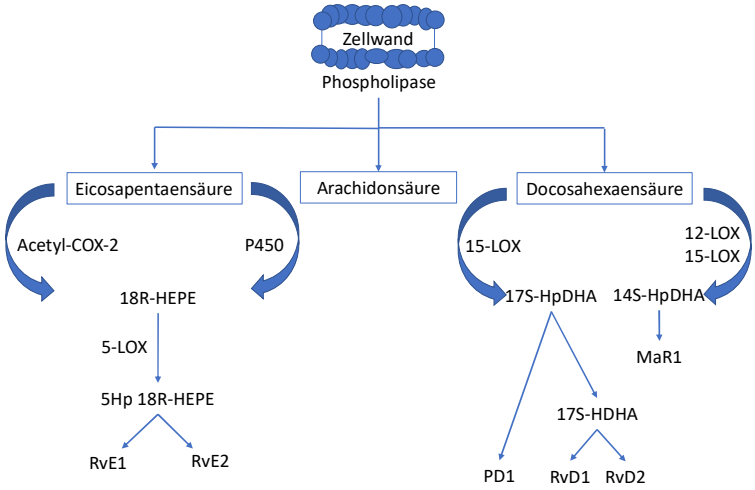

Abbildung 7: Metabolisierung von Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA). Metabolisierung von Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) zu Resolvinen (Rv) der E- und D- Serie (modifiziert nach (63)).

1.7.2 Entzündungshemmender Effekt von Ω-3-Fettsäuren-Derivaten

Ω-3-Fettsäuren wirken auf zahlreiche pathophysiologische Prozesse und haben einen immunmodulierenden Effekt im Inflammationsgeschehen. Besonders die antiinflammatorischen Eigenschaften von EPA und DHA wurden oft im Rahmen entzündlicher Erkrankungen, wie ARDS, Sepsis und Rheumatoide Arthritis untersucht. Entscheidend für die Wirksamkeit dieser Fettsäuren ist der Gehalt an Ω-3- und Ω-6-Fettsäuren innerhalb der Zellmembran, der stark von der Ernährung beeinflusst werden kann.

So konnte in Studien nachgewiesen werden, dass eine erhöhte diätetische Zufuhr von Ω-3 -Fettsäuren deren Gehalt in Zellmembranen von Entzündungszellen steigerte, während der Gehalt an Ω-6-Fettsäuren (AA-Anteil) abnahm (73–77). Ein vermindertes Vorhandensein von wirksamen AA-Eicosanoiden (z. B. LTB_4) führt dazu, dass die Chemotaxis von Leukozyten herabgesetzt wird, da die Expression von Adhäsionsmolekülen behindert wird und es zu einer geschwächten Adhäsion und Migration der Entzündungszellen kommt (76).

Weitere Studien zeigten, dass es nach einigen Wochen einer auf Ω-3-Fettsäuren basierenden Ernährung zu einer Suppression der proinflammatorischen Zytokinsynthese kam, vor allem von TNF-α, IL-1 und IL-6 (78), außerdem zu einer reduzierten Produktion der AA-Derivate TxA_2, PGE_2, PGI_2 und LTB_4. Die aus dem Cyclooxygenase- und Lipoxygenase Stoffwechselweg abgeleiteten EPA Lipidmetabolite (Resolvine der E-Serie) wurden im Gegenzug verstärkt synthetisiert und führten zu einer deutlich reduzierten inflammatorischen und vasomotorischen Antwort (79,80).

Durch die Aktivierung des antiinflammatorischen Transkriptionsfaktors *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR-γ) und über die Bindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR120 von Immunzellen, können Metabolite der Ω-3-Fettsäuren zudem die Phosphorylierung des IκB und damit die Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-κB hemmen. Dadurch wird die Synthese proinflammatorischer Zytokine, Adhäsionsmoleküle vermindert (75,76,81). Weiterhin kann durch die Bindung an PPAR-γ die Proliferation von Peroxisomen (Zellorganellen) eingeleitet werden, die für den Abbau von entzündungsfördernden Prostagladinen, Leukotrienen und PUFAs über β-Oxidation verantwortlich sind (82).

Durch den alimentär bedingten vermehrten Einbau von Ω-3-Fettsäuren kommt es zusätzlich zu einer Erhöhung der Membran-Fluidität (sog. *lipid rafts)*. Diese funktionellen, sich innerhalb der Zellmembran befindenden Mikrodomänen, besitzen unterschiedliche Eigenschaften. Sie beinhalten Proteine, Rezeptoren und Enzyme und sind an der Signaltransduktion, Aktivierung und Proliferation von Entzündungszellen und somit an der Inflammationregulation beteiligt (75,76).

Die aus der EPA und DHA bereits beschriebenen metabolisierten Resolvine der E- und D-Serie, sowie die Protektine weisen ein hohes antiinflammatorisches Potential auf und sind an der Entzündungsresolution maßgeblich beteiligt, indem sie u. a. die Leukozytenmigration und die Zytokinsynthese (IL-1 und TNF-α) hemmen (76).

Resolvine sind in den letzten Jahren vermehrt zum Gegenstand der aktuellen Forschung geworden. Sie wurden von der Arbeitsgruppe um Charles Serhan entdeckt und leiten sich von den Produkten ab, die die Auflösung der Inflammation bewirken: *Resolution phase interaction products* (83). Abhängig vom jeweiligen Substrat teilen sie sich in unterschiedliche Untergruppen auf. Die E-Serie wir über die EPA abgeleitet, die D-Serie über die DHA (57). Die Subtypen werden wiederum von E1 bis E5, beziehungsweise von D1 bis D4 klassifiziert.

Die Resolvine der E-Serie werden aus EPA mittels zweifacher Oxygenierung synthetisiert. Initial erfolgt über die PLA_2 eine Freisetzung der EPA aus der Endothelmembran. Die intrazellulär acetylierte Cyclooxygenase-2 metabolisiert daraufhin die Ω-3-Fettsäure zu 18R-hydro(peroxy)-EPA (18R-HPEPE). Die weitere Hydroperoxidation geschieht in neutrophilen Granulozyten durch die 5-Lipoxygenase. Das daraus entstandene Zwischenprodukt 5S-Hydroperoxy-18-hydroxy-EPE kann anschließend zum Resolvin E2 (RvE2) enzymatisch reduziert werden oder zum 5S (6) -Epoxy- 18-Hydroxy-EPE epoxidiert werden, um abschließend zum Resolvin E1 (RvE1) hydrolisiert werden zu können (10,84) (Abbildung 3 und 7).

Resolvine der D-Serie entstehen neben der Biosynthese über die endotheliale 15-Lipoxygenase auch durch die acetylierte COX-2 vermittelte Metabolisierung von DHA. Die Reaktionsabfolge entspricht den Umwandlungsschritten der für RvE1. Nach zwei Hydroperoxidationsschritten an den Kohlenstoffatomen C-17 und C-7 bzw. C-4 erfolgt eine Epoxidation. Die entstandenen Zwischenprodukte werden auf unterschiedliche Weise hydrolisiert, sodass in Folge die Resolvine D1 bis D4 entstehen (84–86).

Derzeit sind zwei Rezeptoren bekannt, über die Resolvine, vornehmlich RvE1, ihre Aktivität ausüben. So konnte für RvE1 eine hohe Affinität zu dem auf Monozyten und dendritischen Zellen befindlichen G-Protein-gekoppelten Chemokin Rezeptor 23 (ChemR23, CMKLR1) und dem granulozytären Leukotrien B4 Rezeptor 1 (BLT1) nachgewiesen werden (10). Die immunmodulierenden Effekte wirken bei den beiden genannten Rezeptoren unterschiedlich. In einer Studie von Yang *et al.* zeigte sich, dass RvE1 über den BLT1 Rezeptor eine gegenregulatorische Wirkung hinsichtlich des stark proinflammatorischen Eicosanoids LTB_4 ausübt (87), wohingegen über den Chemokin 23 Rezeptor ein antiinflammatorischer Einfluss auf die Leukozytenaktivität, die Extravasation und die NF-κB Aktivität genommen wird (54,57,88).

Weitere *in vivo* Versuche zeigten unter RvE1 Einfluss eine reduzierte Wechselwirkung zwischen Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten (*polymorphonuclear*

leukocytes, PMN) mit herabgesetzter Transmigration, einer gesteigerten PMN-Apoptose im Gewebe und eine stimulierende Wirkung auf die Phagozytose der Makrophagen. Weiterhin konnte ein erhöhter lymphatischer Abtransport der Phagozyten, sowie eine gedrosselte proinflammatorische Zytokinsekretion beobachtet werden. All diese Effekte führten im Tierversuch zur schnelleren Auflösung der inflammatorischen Aktvität (10,12,89).

Anhand ähnlicher Studien konnte nachgewiesen werden, dass die von der DHA abgeleiteten Resolvine eine Suppression der TNF-α induzierten IL-1 β Transkription bewirken mit verminderter leukozytäre Infiltration ins Gehirn und in die Haut (90).

1.8 Fragestellung

Zum Zwecke der Untersuchung der Prozesse, die zur Pathogenese des akuten Atemnotsyndroms (ARDS) führen, werden in der vorliegenden Dissertation die zellulären Auswirkungen des Fettsäurederivats 18R-HEPE, einer Vorstufe von Resolvin E1, auf den Chemerin-Rezeptor 23 (ChemR23) im Mausmodell des akuten Lungenversagens untersucht.
Hierzu sollten folgende Fragestellungen untersucht werden.

A) Ist ein Unterschied hinsichtlich der Leukozytenmigration nach intratrachealer LPS-Instillation in Lunge und bronchoalveolärer Lavage zwischen Wildtyp und ChemR23-KO-Mäusen erkennbar?

B) Welche immunzelluläre Auswirkung hat die Gabe von 18R-HEPE auf Wildtyp und ChemR23-KO-Maus nach LPS-Stimulation?

C) Welchen Effekt übt die Verabreichung von 18R-HEPE auf die Apoptose und Nekrose von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen/Monozyten im alveolären Kompartiment im Wildtyp und ChemR23-KO aus?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere und Material für Tierhaltung und Tierversuche

- Chemerin-Rezeptor 23-KO-Mäuse: Cmklr1^{tm1Drg} (auf der genetischen Basis der C57BL/6N-WT Mauslinie gezüchtet), Takeda Cambridge Ltd., Cambridge, United Kingdom
- Infektionsstimulus: Lipopolysaccharid von E. coli (Serotyp 0111:B4); Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Käfige: Makrolon, Typ II L; Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland
- Ketamin 10%; bela - pharm, Vechta, Deutschland
- Narkosemittel: Xylaxin 2%; Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland
- Tierfutter: Ssniff R/M-H, Alleinfuttermittel für Ratten- und Mäuse-Haltung; ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
- Tierstreu: Altromin Tiereinstreu-Granulat, Altromin GmbH & Co. KG, Lage Lippe, Deutschland
- Wildtyp-Mäuse: C57BL/6N, Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Chirurgisches Operations- und Injektionsbesteck, Scheren; F.S.T. Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
- CO_2 Brutschrank Type Heracell; Fa. Heraeus, Thermo scientific, Hanau, Deutschland
- Deckgläser; R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- Dialux Mikroskop; Olympus, Wiesbaden-Delkheim, Deutschland
- FACS Gerät BD FACSCanto II, Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland

- Falcon Tubes 15ml und 50ml; Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Neubauer Zählkammer; Labor Optik, Friedrichsdorf, Deutschland
- Operationsmikroskop: Stereolupe Leica MS 5; Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland
- Pinzetten; Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
- Pipette Eppendorf Research; C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Pipetboy Acu; Integra Biosciences Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland
- Probematerialröhrchen: Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5ml; C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Sarstedt-Röhrchen 5ml (FACS); Sarstedt AG & Co. Nümbrecht, Deutschland
- Schüttler IKA Vibrax; VXR IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland
- Sterilbank Hera safe Typ HS 15; Fa. Heraeus, Thermo scientific, Hanau, Deutschland
- Sterile 1ml Tuberculinspritzen Luer; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Sterile 10 ml Spritzen Luer; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Sterile Kanülen 20G/30G, Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Sterile serologische Pipetten 5, 10, 25ml; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- Sterile Siebe/Cell Strainer 100µm Falcon; Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Venenverweilkanüle: Sterile Vasofix safety 20G x 1¼; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Zentrifuge Mikro 22R; Fa. Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
- Zentrifuge Rotina 460R; Fa. Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

- (+/-)-18-Hydroxy-5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 16E-eicosapentaenoic acid, C20H30O3, in Ethanol gelöst; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, 48108 USA
- Ammoniumchlorid (NH4Cl); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Aqua dest.; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Augensalbe: Bepanthen Augen- und Nasensalbe 5g; Roche, Eppstein-Bremthal, Deutschland

- Braunoderm, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- BSA (Bovine Serum Albumin); PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Collagenase from Clostridium histolyticum; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Dinatriumsalz Dihydrat; C. Roth GmbH & Co.,Karlsruhe, Deutschland
- Deoxyribonuclease I from bovine pancreas; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Desinfizierende Lösung und Infusionslösung, Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
- EDTA 1% Fertiglösung; Biochrom GmbH; Berlin, Deutschland
- Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA); C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
- Hyaluronidase from bovine testes; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Isotonische Natriumchlorid-Lösung 0,9%; B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
- Natrium Azide (NaN3); Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO3); C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
- Phosphate-Buffered-Salt-Solution (PBS); Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland

2.1.4 Antikörper

- Annexin V; BioLegend, San Diego, Kalifornien USA
- Anti-Mouse CD 45.2 PE Clone: 104; eBioscience, Frankfurt, Deutschland
- Anti-Mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Clone: RB6-8C5; BioLegend, San Diego, Kalifornien USA
- APC CD 11b Clone: M1/70; eBioscience, Frankfurt, Deutschland
- APC/Cy7 Anti-Mouse CD3ε Clone: 145 - 2C11; BioLegend, San Diego, Kalifornien USA
- Brillant violet 510 GR. 1, BD Biosciences, San Jose, Kalifornien USA
- BV 421 Rat Anti-Mouse Siglec-F Clone: E50-2440; BD Biosciences, San Jose, Kalifornien USA
- FITC Anti-Mouse CD 19 Clone: 6D5; BioLegend, San Diego, Kalifornien USA
- FITC Rat Anti-Mouse Ly-6G and Ly-6c Clone RB6-8C5, BD Pharmingen, San Jose, Kalifornien USA

- PE/Cy7 Anti-Mouse CD 11C Clone: N418; BioLegend, San Diego, Kalifornien USA
- PE Rat Anti-Mouse Siglec-F Clone: E50 – 2440; BD Biosciences, San Jose, Kalifornien USA
- Per CP 5.5 7AAD, BioLegend, San Diego, Kalifornien USA
- Per CP 5.5 Anti-Mouse CD 19 Clone: 6 D5; BioLegend, San Diego, Kalifornien USA

2.2 Methoden

2.2.1 Untersuchung *in-vivo* Mausmodell

2.2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation basieren auf Daten von insgesamt 72 Mäusen.

Als Versuchstiere verwendeten wir zwölf bis sechzehn Wochen alte C57/BL6N-Mäuse. Die ChemR23-KO-Mäuse wurden von der Firma Takeda Cambridge Ltd. bezogen. Die Wildtyp (WT) Wurfgeschwister aus F1 Paarungen wurden als Kontrollen für ChemR23-KO- (ChemR23 -/-) Mäuse verwendet. Es gingen nur männliche Tiere in die Versuche ein. Das Gewicht der Tiere betrug 25-30g. Alle Verfahren wurden von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießen überprüft und genehmigt (Az. Gi 20/10 Nr. 43/2012). Die Durchführung der Präparation erfolgte durch die Tierärztin Frau Dr. med. vet. J. Ott.

Die Aufzucht und Haltung der Versuchsmäuse erfolgte entsprechend artgerechter Haltung in transparenten Polycarbonatkäfigen unter pathogenfreien Bedingungen. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20-22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Jungtiere wurden im Alter von vier Wochen abgesetzt, geschlechtlich getrennt und in Gruppen zu maximal fünf Tieren aufgezogen.

2.2.1.2 Experimentelle Gruppen und zeitlicher Ablauf

Tabelle 1:LPS-Stimulationsgruppen: 10 µg LPS intratracheale (i. t.) Instillation

1. Gruppe: WT und ChemR23 -/- unstimuliert (keine LPS) 0 h
2. Gruppe: WT und ChemR23 -/- mit LPS, Euthanasie 24 h nach LPS
3. Gruppe: WT und ChemR23 -/- mit LPS, Euthanasie 72 h nach LPS
4. Gruppe: WT und ChemR23 -/- mit LPS, Euthanasie 120 h nach LPS

2.2.1.3 18R-HEPE Behandlung mit 2 µg subcutan (s. c.) pro Mausgruppe im festgelegten Zeitintervall

Es wurden die Werte einer LPS-unbehandelten WT und ChemR23 -/- Mausgruppe zum Zeitpunkt 0 Stunden ermittelt (*base line*). In einer Zeitreihe zwischen 24 Stunden und 120 Stunden nach LPS-Applikation i.t. und 18R-HEPE-Injektion s.c. erfolgte die Euthansie und Auswertung.
Die subcutane18R-HEPE-Injektion wurde in einem festgelegten Zeitintervall appliziert. Die erste Gabe erfolgte 6 Stunden nach LPS-Stimulation, die nächste nach weiteren 6 Stunden (24-stündige Versuchsgruppe). Bei der 72- und 120-stündigen Versuchsgruppe erhielten die Tiere die 18R-HEPE-Injektion 6 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden, 36 Stunden und 48 Stunden nach Lipopolysaccharid-Gabe (Abbildung 8).

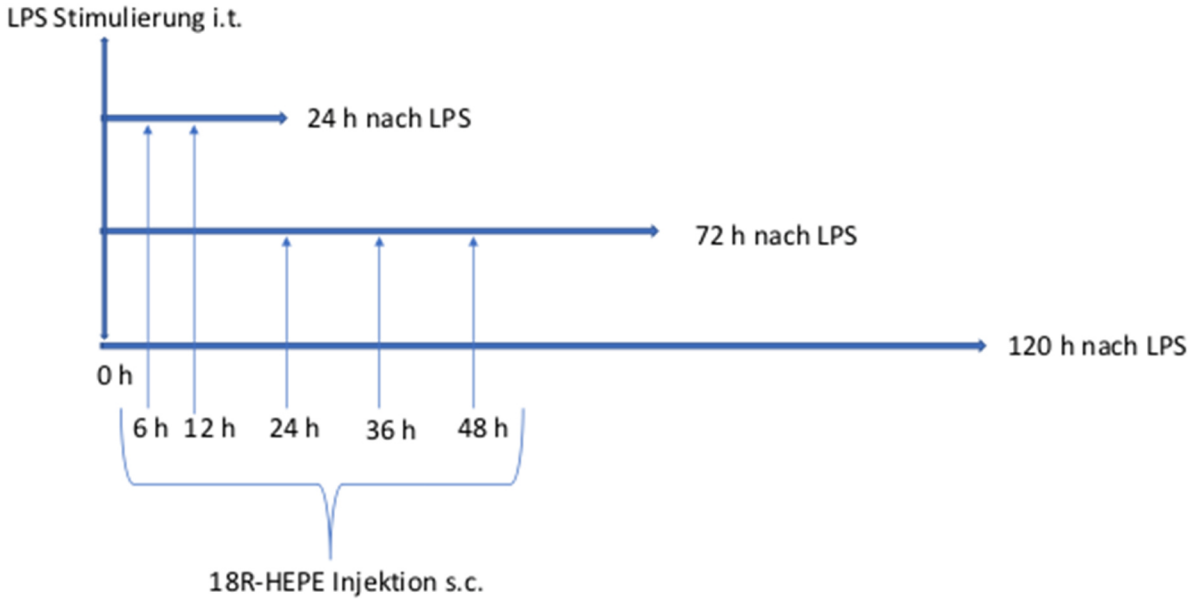

Abbildung 8: Zeitlicher Versuchsablauf mit LPS-Instillation und 18R-HEPE-Injektion

2.2.1.4 Intratracheale Applikation von LPS

Um eine pulmonale Entzündungsreaktion auszulösen, wurde intratracheal das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) von *Escherichia coli* (Serotyp 0111: B4) appliziert. Um die Mäuse zu anästhesieren, verwendeten wir ein Gemisch auch 200µl NaCl 0,9%, 100µl Xylazin (Rompun) 2% und 100µl Ketamin (Ketavet) 10 % mit einer Dosierung

von 0,25mg/kg KG. Davon wurden einer Maus 80-100µl intraperitoneal (i. p.) injiziert. Um eine ausreichende Narkosetiefe festzustellen, erfolgte ein Schmerzreiz mit einer Pinzette zwischen den Zehen. Die Tiere wurden anschließend an den oberen Schneidezähnen an eine Aufhängung fixiert und unter mikroskopischer Sicht instilliert. Mit Hilfe einer Pinzette und einer Schwanenhalslampe konnte vorsichtig eine Venenverweilkanüle der Größe G20 durch die Stimmritze in die *Trachea* vorgeschoben werden. Es wurden insgesamt 50µl LPS-Lösung (10µg LPS in NaCl 0,9% Lösung) in drei Portionen (10µl, 20µl, 20µl) intratracheal instilliert. Im Anschluss setzten wir die Tiere wieder in ihre Käfige zurück und überwachten sie bis zum Einsetzen der Vigilanz.

2.2.1.5 Anästhesie und Tötung

Für die bronchoalveoläre Lavage (BAL) und die Lungenentnahme wurden die Mäuse zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten in Narkose versetzt und durch nachfolgenden Blutentzug aus der *Vena cava caudalis* euthanasiert. Für die Narkose wurde den Tieren eine Lösung aus 2 % Xylazin (16mg/kg KG), 10 % Ketamin (80mg/kg KG) in 0,9 % NaCl in einem Gesamtvolumen von 50µl intraperitoneal (i. p.) injiziert.

2.2.1.6 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Nach der Euthanasie legten wir die Mäuse auf den Rücken, fixierten sie mit Nadeln an den Extremitäten und bereiteten sie für die weitere Präparation vor. Es erfolgte ein ca. 2 cm langer Schnitt in der Medianen der vorderen Halsseite. Die seitlich liegenden subkutanen Speicheldrüsen wurden mittig stumpf mit einer Pinzette abpräpariert. Im Anschluss wurde der *M. trachealis* durchtrennt, um einfacher an die Luftröhre zu gelangen. Nachdem die *Trachea* freipräpariert war, setzten wir einen Schnitt zwischen zwei Knorpelstangen und schoben vorsichtig einen Katheter (Vasofix 20G) vor, der mit Bindfaden fixiert wurde.

Nach Kontrolle der Kanülenlage wurde die Lunge mit 200 µl Phosphatpuffer (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) vorgedehnt, der anschließend wieder reaspiriert wurde. Im Anschluss erfolgte die gleichmäßige Lavage der beiden Lungenflügel mit einem Gesamtvolumen von 1,5 ml 2mmol EDTA in PBS (Ethylendiamintetetraessigsäure). Die gesammelte Lavageflüssigkeit wurde nach Entnahme bei 320 G (entspricht 1200 *revolutions per minute*) und 4 °C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde

anschließend vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das im Eppendorfer Röhrchen übriggebliebene Pellet resuspendierten wir in 1ml Färbepuffer (*Antibody staining buffer*). Danach bestimmten wir mithilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl.

2.2.1.7 Lungenentnahme

Um das Lungenparenchym blutleer zu erhalten, wurde nach dem Tod der Mäuse die Lunge mit 10 ml 0,9%-iger Natriumchloridlösung freigespült. Anschließend wurde die Lunge entnommen, fein zerschnitten und in einem Enzymcocktail, bestehend aus Collagenase (480 U/0,4mg), Hyaluronidase (440 U/mg) und DNAse (300U/0,085 mg) in 5 ml PBS, gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C im Thermoschüttler in Dunkelheit inkubiert. Das verdaute Lungenhomogenat wurde im nächsten Schritt durch einen 100 µm *Cell Strainer* gegeben, mit einem Spritzenstempel vorsichtig durchgedrückt und mit 20 ml PBS nachgespült. Nach Zentrifugation (430 G, 10 Minuten, 4 °C) der gewonnenen Zellsuspension wurde der Überstand abgekippt und das übriggebliebene Zellpellet mit 5 ml Lysepuffer resuspendiert und bei Raumtemperatur 5 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Dieser Schritt war notwendig, um Erythrozyten zu entfernen und eine Verfälschung der FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting)* Analyse zu vermeiden. Im Anschluss wurde die Lyse mit 20 ml Färbepuffer (*Antibody Staining Buffer)* abgestoppt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt resuspendierten wir das Pellet in 1 ml Färbepuffer.

2.2.1.8 Leukozytenzählung

Nach der Resuspension der BAL - und Lungenzellen wurden jeweils 10 µl mit Trypanblau Lösung (1:10 Verdünnung) versetzt (zur besseren Beurteilung der vitalen Zellen) und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt (4 große Eckquadrate). Der Mittelwert wurde gebildet und die Gesamtzellzahl dann mit der folgenden Formel bestimmt:

Ausgezählte Zellen / 1mm² (Fläche des Quadrates) x 0,1 mm (Kammertiefe) x 1 (Verdünnungsfaktor)

2.2.2 Durchflusszytometrie (*Fluorescence activated cell sorting*, FACS)

2.2.2.1 Markierung von Oberflächenantigenen mit Hilfe monoklonaler Antikörper

Mittels monoklonaler Antikörper können zellspezifische Antigenstrukturen auf den Oberflächen der zu bestimmenden Leukozyten markiert werden und somit die verschiedenen Zelltypen per *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) voneinander unterschieden werden. Für die Bestimmung der unterschiedlichen Zellpopulationen in der BAL und der Lungensuspension wurde ein *Screening Panel* aus unterschiedlichen mehrfarbmarkierten monoklonalen Antikörpern verwendet (Tabelle 4 und 5). Zur Unterscheidung zwischen apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen wurde zusätzlich in der BAL Annexin V und 7AAD (7-Aminoactinomycin D) genutzt. Die Fluorochrom konjungierten monoklonalen Antikörper wurden so ausgewählt, dass die durch Laserstrahlen angeregten Emissionsspektren voneinander abwichen und somit eine deutliche Analyse der Leukozyten und Subpopulationen erzielt werden konnte.
Für die Anfärbung wurden aus der BAL und dem Lungenhomogenat jeweils eine Million Zellen verwendet und in einem Endvolumen von 100µl überführt. Alle Arbeiten wurden auf einer Sterilbank bei Raumtemperatur und geringem Lichteinfall (Verhinderung des Ausbleichens der Antikörper) bearbeitet.

Tabelle 2: Protokoll extrazelluläre Antikörperfärbungen der BAL und der Lunge

1. Zugabe der extrazellulären Antikörper zu den BAL und Lungenzellen
2. 15 min Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit
3. 2-malige Waschdurchgänge in 2 ml Färbepuffer, Zentrifugation bei 320 G über 5 min und 4°C Dekantieren; bei der BAL zusätzlich 2-mal mit Annexin Puffer waschen.
4. FACS-Messung der Lungenprobe

Tabelle 3: Protokoll intrazelluläre Antikörperfärbungen in der BAL

1. nach zweimaligem Waschen mit Annexin Puffer Zugabe von 2µl Annexin V
2. 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit
3. Zugabe von 5µl von 7AAD und Inkubation von 5 Minuten
4. FACS-Messung

Tabelle 4: Antikörper-Cocktail für BAL

Farbstoff	Antigen	Detektierte Zellen	Antikörper Menge
BV 510	GR1	PMN	0.5 µl
PE-Cy7	CD 11c	DC	1µl
PE	SiglecF	Makrophagen	1µl
FITC	CD 19	B-Lymphozyten	1µl
APC-Cy7	CD 3	T-Lymphozyten	1µl
APC	CD 11b	PMN/Makrophagen	1µl
PerCP-7AAD	DNA	Nekrotische Leukozyten	5µl
Annexin V	Phosphatidylserin	Apoptosezellen	2µl

Tabelle 5: Antikörper-Cocktail für Lunge

Farbstoff	Antigen	Detektierte Zellen	Antikörper Menge
PE	CD 45.2	Leukozyten	1µl
APC	CD 11b	PMN/Makrophagen	1µl
PE-Cy7	CD 11c	DC	1µl
PerCP-Cy 5.5	CD 19	B-Lymphozyten	1µl
APC-Cy7	CD 3	T-Lymphozyten	1µl
BV 421	SiglecF	Makrophagen	1µl
BV 510	GR. 1	PMN	1µl

2.2.2.2 Prinzip der FACS Analyse

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Zelltypisierungen von fluoreszenz-antikörpermarkierten oder gefärbten Zellensuspensionen vorzunehmen und quantitativ Oberflächenmoleküle, intrazelluläre Proteine und DNA zu bestimmen.

Bei der FACS-Analyse werden Zellen durch eine Kapillare gesaugt und in einem koaxialen Hüllstrom fokussiert und einzeln durch eine Durchflusszelle (*Flow cell*) geleitet. Die fluoreszenzmarkierten Zellen werden von Laserstrahlen angeregt und durch den Flüssigkeitsstrom gehalten (Hydrodynamische Fokussierung). Das dabei erzeugte

Streu- und emittierte Fluoreszenzlicht wird separat von Filtern und Detektoren aufgenommen.

Anhand des detektierten Streulichtes kann die Größe und Granularität der einzelnen Zellen bestimmt werden. Hierfür wird zum einen die Intensität des Lichtes, welches in Vorwärtsrichtung (*Forward Scatter*, Vorwärtsstreulicht) streut, gemessen und die Zellgröße ermittelt und zum anderen wird die Lichtintensität in Seitwärtsrichtung detektiert (*Side Scatter*, Seitwärtsstreulicht), die die Zellgranularität angibt. Aufgrund dieser zwei Messeigenschaften lassen sich in einer Leukozytensuspension die drei Subgruppen Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten voneinander abgrenzen (Abbildung 9).

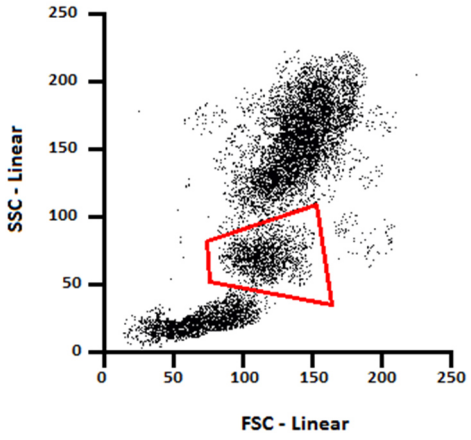

Abbildung 9: Typisierung von ungefärbten Zellen anhand der Lichtstreuung (*Dot Plot*)

Große Zellen befinden sich rechts in der Abbildung. Zellen mit hoher Granularität befinden sich oben. Kleinere, glatte Zellen sind links unten zu erkennen.

Zur präziseren Bestimmung der Zellpopulationen können spezifische Fluoreszenzmarkierungen genutzt werden, da nur wenige Zellen selbst fluoreszierendes Licht emittieren. Dazu werden Fluorochrom konjugierte Antikörper verwendet, die sich an die passenden Oberflächenantigene setzen. Werden diese unterschiedlichen Farbstoffe von verschiedenfarbigen Lasern angestrahlt, so kommt es zu einer Absorption von Lichtenergie in einem für den Fluorochrom spezifischen Wellenbereich. Die Elektronen werden hierdurch angeregt und geraten auf ein höheres Energieniveau. Beim Abfall der Elektronen auf das Ausgangsenergieniveau wird die freiwerdende Energie als Licht emittiert (Fluoreszenz) und von den Detektoren des FACS-Gerätes erfasst.

Die ermittelten Messwerte werden im Anschluss mit der Gerätesoftware grafisch dargestellt. Diese Ergebnisse können in Form von *Dot Plots* (Zweiparameterdarstellung) (Abbildung 10) und Histogrammen (Einparameterdarstellung) dargestellt werden.

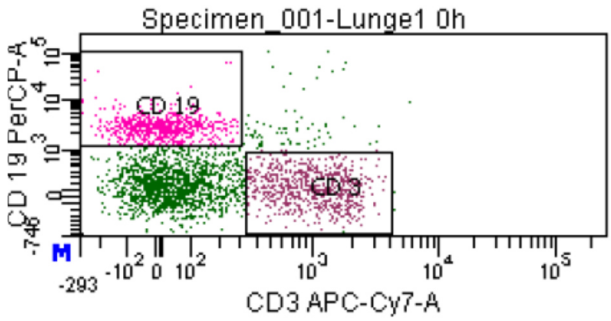

Abbildung 10: Beispielhafte Darstellung von gefärbten Zellen nach der FACS-Messung
Das Bild zeigt Lymphozyten nach dem *Gating*. CD3 exprimierende T-Zellen und CD19 positive B-Zellen werden in dem Diagramm jeweils in Dunkelrot oder Pink dargestellt.

2.2.2.3 Kompensation und Messung am FACS-Gerät

Am FACS-Gerät werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig verwendet (Tabelle 4 und 5), deren Signale durch Farbfilter getrennt in den verschiedenen Detektoren gemessen werden. Weil viele Fluoreszenzfarbstoffe nicht streng eine Farbe ausstrahlen, sondern ein ganzes Spektrum, kann das zu spektralen Überschneidungen führen. Das beeinträchtigt die Beurteilung der Ergebnisse. Es ist allerdings möglich, durch einfache Versuche zu ermitteln, wie stark ein Farbstoff in einen anderen Kanal streut, um anschließend die spektralen Überlappungen rechnerisch zu korrigieren. Diesen Vorgang nennt man Kompensation.

Für die Kompensation wurden ungefärbte, gefärbte BAL- und Lungenproben und sogenannte Kompensationsperlen *(beads)* verwendet. Dadurch konnte die Justierung der optischen Bank zur Optimierung der Parameter Seitwärtsstreulicht, Vorwärtsstreulicht und Fluoreszenzintensität erfolgen.

Nachdem die FACS-Voreinstellungen optimiert wurden, fand die Messung der gefärbten BAL- und Lungenproben statt. Hierfür wurden je 100.000 Zählungen (*counts*) aus 100 µl gefärbter Zellsuspension durch das FACS-Gerät vorgenommen. Die Bearbeitung und

Analyse erfolgte im Anschluss der Messung mit Hilfe der Gerätesoftware „FACSDiva“ Version 6.1.3 von Becton Dickinson.

2.2.2.4 Auswertung der FACS Ergebnisse

Durch das Setzen von sogenannten *Gates* konnten die Leukozytenpopulationen Monozyten/Makrophagen (M/M), polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) und Lymphozyten (T- und B Zellen) selektiert und ausgewertet werden (*gating*). Außerdem konnte durch die Verwendung von Annexin V und 7AAD die Anzahl der apoptotischen und nekrotischen Zellen in der BAL bestimmt werden.

2.2.3 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurden bei den Mausgruppen die Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Mittelwerte berechnet. Eine zwei-faktorielle ANOVA wurde angewendet, um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien zu testen. Die Student-Newman-Keuls-Methode folgte als post-hoc-Test auf die Varianzanalyse. Wenn die Werte der Leukozyten und Subpopulationen nicht normalverteilt waren, wurde eine log-Transformation genutzt. Als statistisch signifikant wurde eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen. Die Analyse wurde mit Hilfe des Programms SigmaStat Windows berechnet und die Graphiken mit GraphPad Prism 5.0 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 LPS-stimulierte Leukozytenrekrutierung im Mausmodell

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bei den Versuchstieren mittels LPS (Endotoxin von *Escherichia coli*) eine akute Lungenentzündung ausgelöst, um die leukozytäre Transmigration bei fehlendem und vorhandenem Chemerin-Rezeptor23 unter Einfluss von 18R-HEPE zu untersuchen.

Sowohl beim Wildtyp als auch bei den ChemR23-KO-Mäusen führte die intratracheale Applikation von LPS zu einem deutlich reduzierten Allgemeinzustand und

krankheitstypischen Verhaltensweisen, die sich durch motorische Inaktivität und gesträubtes Fell äußerten (91) (Dissertation Ott, J.R, 2008).
Nach einem Zeitraum von 0, 24, 72 oder 120 Stunden wurden die Tiere für die bronchoaveoläre Lavage (BAL) und Lungenentnahme euthanasiert. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl in der BAL und im Lungenhomogenat mittels Neubauer Zählkammer mikroskopisch ermittelt und im weiteren Schritt die verschiedenen leukozytären Subpopulationen polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), Monozyten/Makrophagen (M/M) und Lymphozyten anhand ihrer spezifischen Oberflächenantigen-Marker fluoreszenzmarkiert und durchflusszytometrisch detektiert.
Zur Bestimmung der Leukozytenzahl in der BAL bzw. im Lungenhomogenat wurde die Summe der durchflusszytometrisch detektierten PMN, Makrophagen und Lymphozyten ermittelt und auf die jeweiligen Gesamtzellsuspensionen in einem Milliliter (ml) hochgerechnet.

3.1.1 Gesamtzahl der Leukozyten im Lungenhomogenat nach LPS- und 18R-HEPE-Injektion

In der Gruppe der 18R-HEPE-unbehandelten Wildtyp (WT) Mäuse befanden sich im gesamten Lungenhomogenat zum Zeitpunkt 0 Stunden 1,07 ± 0,11 x 10^6 Leukozyten (n=3) (Abbildung 11 a). Nach Applikation von 10µg LPS kam es nach 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg auf 3,82 ± 0,13 x 10^6 Leukozyten (n=3; $p < 0,05$) pro Lungensuspension. Die Zellzahl stieg nach weiteren 48 Stunden auf ihr Maximum von 7,37 ± 0,80 x 10^6 (n=4, $p < 0,05$) und fiel dann innerhalb von 48 Stunden auf 5,25 ± 0,49 x 10^6 (n=3) ab (Abbildung 11 a). Im zeitlichen Verlauf waren innerhalb der WT-Mausgruppe die ermittelten Zellzahlen bedeutend unterschiedlich ($p < 0,05$).
Das Lungenhomogenat der mit 18R-HEPE-behandelten WT-Mäuse zeigte nach LPS-Stimulation ebenfalls einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg der Leukozytenzahl (Abbildung 10 a). Allerdings war die Anzahl der gemessenen Leukozyten im Vergleich zur unbehandelten WT-Gruppe zu allen Zeitpunkten signifikant unterschiedlich. So lag im Lungenhomogenat der 18R-HEPE-behandelten Mäuse nach 24 bzw. 72 Stunden der LPS-Instillation die doppelte Menge an Leukozyten vor. Die höchste Leukozytenzahl wurde in beiden Gruppen nach 72 Stunden erreicht. Jedoch fiel in der 18R-HEPE-behandelten Gruppe die Anzahl zum 120-stündigen Zeitpunkt auf ein Drittel des gemessenen Wertes der unbehandelten Gruppe ab (Abbildung 11 a).

Im Lungenhomogenat der unbehandelten ChemR23 -/- Mäuse lag der Ausgangswert (zum Zeitpunkt 0h), ähnlich wie bei den WT-Mäusen, bei 0,94 ± 0,16 x 10^6 Leukozyten (Abbildung 11 a). Wie bei den WT-Mäusen verursachte die LPS-Gabe einen signifikanten Anstieg der Leukozytenzahl. Jedoch wurde bei den ChemR23 -/- Mäusen die maximale Leukozytenzahl (8,07 ± 1,8 x 10^6 Zellen (n=2)) bereits nach 24 Stunden erreicht und blieb bis zum 72-stündigen Messzeitpunkt weitestgehend konstant auf 7,3 ± 0,67 x 10^6 (n=5). Zu einem statistisch ausgeprägten Abfall kam es nach 120 Stunden. Auffällig ist, dass in der WT+18R-HEPE- Gruppe die Leukozytenzahl nach 120 Stunden deutlich niedriger ausfiel (0,90 ± 0,14 x 10^6) und den gleichen Wert wie zum Zeitpunkt 0h aufwies als in der WT-Vergleichsgruppe (Abbildung 11 a).
Analog zum WT wurde auch eine ChemR23 -/- Gruppe mit 18R-HEPE behandelt. Mit einer Anzahl von 3,5 ± 0,56 x 10^6 Leukozyten zeigte sich nach 24 Stunden ein deutlich geringerer Anstieg der Zellzahl im Vergleich zum 18R-HEPE-behandelten WT (ca. 2,6-mal niedriger) und der unbehandelten ChemR23 -/- (ca. 2,3-mal niedriger) Versuchsgruppe (Abbildung 11 a). Erst nach 72 Stunden kam es zu einem ausgeprägten Anstieg der Zellzahl. Die Anzahl der Leukozyten verdreifachte sich auf ein Maximum von 13,51 ± 1,74 x 10^6. Somit lag dieser Wert wesentlich über dem der unbehandelten ChemR23 -/- Vergleichsgruppe ($p < 0,05$). Im weiteren zeitlichen Verlauf konnte ein deutlicher Abfall der Gesamtleukozyten beobachtet werden. Zum 120-stündigen Endmesspunkt wurde eine Zellzahl von 1,8 ± 0,27 x 10^6 ermittelt, die allerdings signifikant oberhalb des Endwertes der unbehandelten ChemR23 -/- Tiere lag (n=4) ($p < 0,05$), aber deutlich unterhalb des Endwertes der WT-Mäuse (Abbildung 11 a).
Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Stimulation mit LPS sowohl bei den WT als auch bei den ChemR23 -/- Mäusen zu einer verstärkten Leukozytenmigration in das Lungenhomogenat führte. Auch die Behandlung beider Mauslinien mit 18R-HEPE führte zu einem deutlichen Anstieg der Leukozyten ins Lungenhomogenat, wenngleich dies bei den ChemR23 -/- Mäusen mit einer zeitlichen Verzögerung geschah.

3.1.2 Effekt der LPS und 18R-HEPE Behandlung auf die einzelnen leukozytären Subpopulationen im Lungenhomogenat

Im Folgenden wurde durchflusszytometrisch der Anteil der neutrophilen Granulozyten (PMN), Monozyten/ Makrophagen (M/M) und Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl im Lungenhomogenat der vier Versuchsgruppen bestimmt.

3.1.2.1 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) im Lungenhomogenat

Für die WT-Gruppe zeigte sich zum Zeitpunkt 0h ein Ausgangswert von 0,27 ± 0,07 x 10^6 (n=3) PMN im Lungenhomogenat (Abbildung 11 b) Nach 24 Stunden der intratrachealen LPS- Applikation stieg die Zahl der PMN sprunghaft auf 3,60 ± 0,73 x 10^6 (n=4) an und erreichte nach weiteren 48 Stunden ein Maximum von 7,1 ± 0,81 x 10^6 Zellen (n=4). In den folgenden zwei Tagen kam es zu einem deutlichen Rückgang der Granulozyten im Lungengewebe auf 1,6 ± 0,33 x 10^6 (n=4). Während des zeitlichen Verlaufs konnte zwischen den einzelnen gemessenen Zeitpunkten eine klare Signifikanz belegt werden ($p < 0,05$).

Im Vergleich zum WT präsentierte sich nach 24-stündiger LPS-Einwirkung bei den mit 18R-HEPE-behandelten WT-Mäusen eine doppelt so starke PMN-Zahl (7,94 ± 0,75 x 10^6 (n=4)) (Abbildung 11 b). In den folgenden 48 Stunden kam es zu einem leichten Anstieg der PMN (9,9 ± 0,37 x 10^6 (n=4)) (Abbildung 11 b). Nach diesem Maximum folgte ein beachtlicher Rückgang der Zellzahl auf 0,71 ± 0,06 x 10^6 (n=4), der 3-fach unter dem 120 Stunden Wert der WT-Vergleichsgruppe lag ($p < 0,05$) (Abbildung 11 b).

Die Granulozyten wiesen zum Zeitpunkt 0h in der Lunge der unbehandelten ChemR23 -/- Gruppe einen nicht signifikanten Unterschied zu den unbehandelten WT-Tieren (0,36 ± 0,08 x 10^6 Zellen) auf (Abbildung 11 b). Innerhalb der ersten 24 Stunden nach LPS-Instillation erfolgte ein deutlicher Anstieg der Neutrophilenzahl auf 9,36 ± 1,9 x 10^6 Zellen. In den darauffolgenden Stunden zeigte sich hingegen ein ausgeprägter Rückgang. So waren in der gesamten präparierten Lunge nach 120 Stunden nur noch 0,47 ± 0,1 x 10^6 Granulozyten vorhanden, also auf einem ähnlich niedrigen Niveau wie zum Ausgangswert (Abbildung 11 b).

Im Vergleich zu den unbehandelten ChemR23 -/- Mäusen zeigte die 18R-HEPE-behandelte ChemR23 -/- Gruppe deutliche signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf nach LPS- Gabe. So konnte im Lungenhomogenat der behandelten Tiere nach 24 Stunden eine PMN-Anzahl von 3,16 ± 0,59 x 10^6 beobachtet werden. Diese war dreimal niedriger als bei den unbehandelten ChemR23 -/- Mäusen und 2,5-fach niedriger als bei der behandelten WT- Gruppe. Allerdings zeigte sich nach 48 Stunden eine deutliche Zunahme der Granulozytenmenge (Abbildung 11 b). Die maximal gemessene Zellzahl wurde zum 72-stündigen Zeitpunkt ermittelt, und lag in etwa doppelt so hoch wie die in der ChemR23 -/- Kontrollgruppe (Abbildung 11 b). Innerhalb der darauffolgenden 48

Stunden kam es zu einem erheblichen Rückgang der PMN. Der Endwert war jedoch bei den 18R-HEPE-ChemR23 -/-Tieren doppelt so hoch wie der in der unbehandelten ChemR23 -/- Gruppe.
Zusammenfassend ist zu erkennen, dass der zeitliche Verlauf der PMN nach LPS-Gabe in etwa dem Zeitverlauf der Gesamtleukozyten entspricht.

3.1.2.2 Monozyten und Makrophagen im Lungenhomogenat

Der in dem gewonnenen Wildtyp Lungenhomogenat gemessene Anteil an Monozyten und Makrophagen (M/M) lag initial ohne LPS-Stimulation bei $0,39 \pm 0,1 \times 10^6$ (n=4) Zellen. Nach LPS-Gabe kam es in den folgenden 72 Stunden zu keiner Erhöhung der Makrophagenzahl. Es zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ein leichter, aber nicht signifikanter Rückgang auf $0,26 \pm 0,08 \times 10^6$ M/M (Abbildung 11 c). Ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) entwickelte sich hingegen nach 120 Stunden. Die ermittelte Anzahl lag bei $1,09 \pm 0,32 \times 10^6$ Zellen und wies damit einen fast dreimal so hohen Wert auf als zum Zeitpunkt 0h (Abbildung 11 c).
Werden 18R-HEPE-behandelte und unbehandelte WT-Gruppen miteinander verglichen, so lässt sich zwischen beiden Mauslinien in den ersten 72 Stunden kein wesentlicher Unterschied im zeitlichen Verlauf erkennen (Abbildung 11 c). Wie auch beim unbehandelten WT stieg bei den 18R-HEPE-behandelten WT nach 120 Stunden die Zahl der M/M an, blieb jedoch im Vergleich dazu 2,5-mal niedriger.
Für beide ChemR23 -/- und ChemR23 -/- + 18R-HEPE-Gruppen zeigten sich innerhalb des 5-tägigen Zeitintervalls keine signifikanten Unterschiede. Der initiale Messwert ohne Endotoxin lag bei $0,26 \pm 0,03 \times 10^6$ Zellen und blieb in den darauffolgenden drei Tagen annährend konstant (Abbildung 11 c). Allerdings konnte nach 120 Stunden ein signifikanter Unterschied zwischen behandelter und nicht behandelter ChemR23 -/- Gruppe beobachtet werden. Nach 18R-HEPE-Gabe war die M/M Zahl ungefähr 3,5-mal höher als ohne Behandlung (Abbildung 11 c). Dies steht im deutlichen Kontrast zu den WT-Tieren, bei denen die 18R-HEPE- Behandlung zu einer Abnahme der M/M führte (Abbildung 11 c).

3.1.2.3 Lymphozyten im Lungenhomogenat

Als weitere leukozytäre Subpopulation wurden in dem homogenisierten Lungenparenchym die Lymphozyten bestimmt. Es zeigte sich in der WT-Gruppe ein Anfangswert von 0,64 ± 0,13 x 10^6 Zellen (n=4) (Abbildung 11 d). Dieser Wert blieb in den darauffolgenden 24 Stunden nach LPS-Instillation annährend konstant, anschließend kam es zu einem signifikanten Anstieg (Abbildung 11 d). Im Gegensatz zu den Neutrophilen und ähnlich wie den M/M kam es bei der unbehandelten WT-Gruppe nach 120 Stunden zu keinem Abfall der Zellen, sondern zu einem leichten Lymphozytenanstieg.

Nach der 18R-HEPE-Injektion zeigte sich innerhalb der WT-Gruppe in den ersten 24 Stunden kein wesentlicher Unterschied zu den unbehandelten WT-Tieren. Nach 72 Stunden kam es hingegen zu einer Verdopplung der Lymphozytenzahl sowohl im Vergleich zu den unbehandelten WT-Tieren als auch zu dem 24-stündigen Wert der behandelten WT- Mausgruppe. Im Gegensatz zum unbehandelten WT fiel bei der 18R-HEPE-behandelten Gruppe die Zellzahl zum 120-stündigen Messzeitpunkt erheblich ab und lag mit mehr als der Hälfte unter dem Wert der WT-Vergleichsgruppe (Abbildung 11 d).

Der Unterschied zwischen WT und ChemR23 -/- war hinsichtlich des Migrationsverhaltens bei den Lymphozyten besonders ausgeprägt. So unterschieden sich die zum Zeitpunkt 0 Stunden gemessenen Zellzahlen bereits signifikant voneinander ($p < 0,05$). In der WT-Reihe waren ohne LPS-Stimulation 0,64 ± 0,13 x 10^6 Lymphozyten (n=4) im Lungenhomogenat vorhanden, in der ChemR23 -/- Gruppe 0,32 ± 0,06 x 10^6 (n=4). 24 Stunden nach Endotoxin-Gabe war bei den ChemR23 -/- Tieren bereits eine maximale Lymphozytenzahl (11-facher Anstieg zum *base lin*e Wert) festzustellen, wohingegen in der WT-Gruppe kein nennenswerter Anstieg stattfand. In den darauffolgenden 48 Stunden kam es bei den ChemR23 -/- Mäusen zu einem vergleichsweisen schnellen Rückgang der Lymphozytenzahl, der bis zum Versuchsende weiter anhielt. Im Gegensatz dazu erfolgte bei den WT-Mäusen eine stetige Zunahme der Zellzahl.

Bei den ChemR23 -/- Tieren zeigte die Behandlung mit 18R-HEPE einen Effekt im zeitlichen Messverlauf. Die maximale Zellzahl wurde im Gegensatz zur unbehandelten ChemR23 -/- Gruppe erst nach 72h erreicht, wohingegen diese ohne 18R-HEPE-Intervention bereits 48 Stunden früher erzielt wurde.

Im Vergleich zum 18R-HEPE-behandelten WT lag die Lymphozytenzahl bei den behandelten KO-Mäusen durchgehend signifikant niedriger.

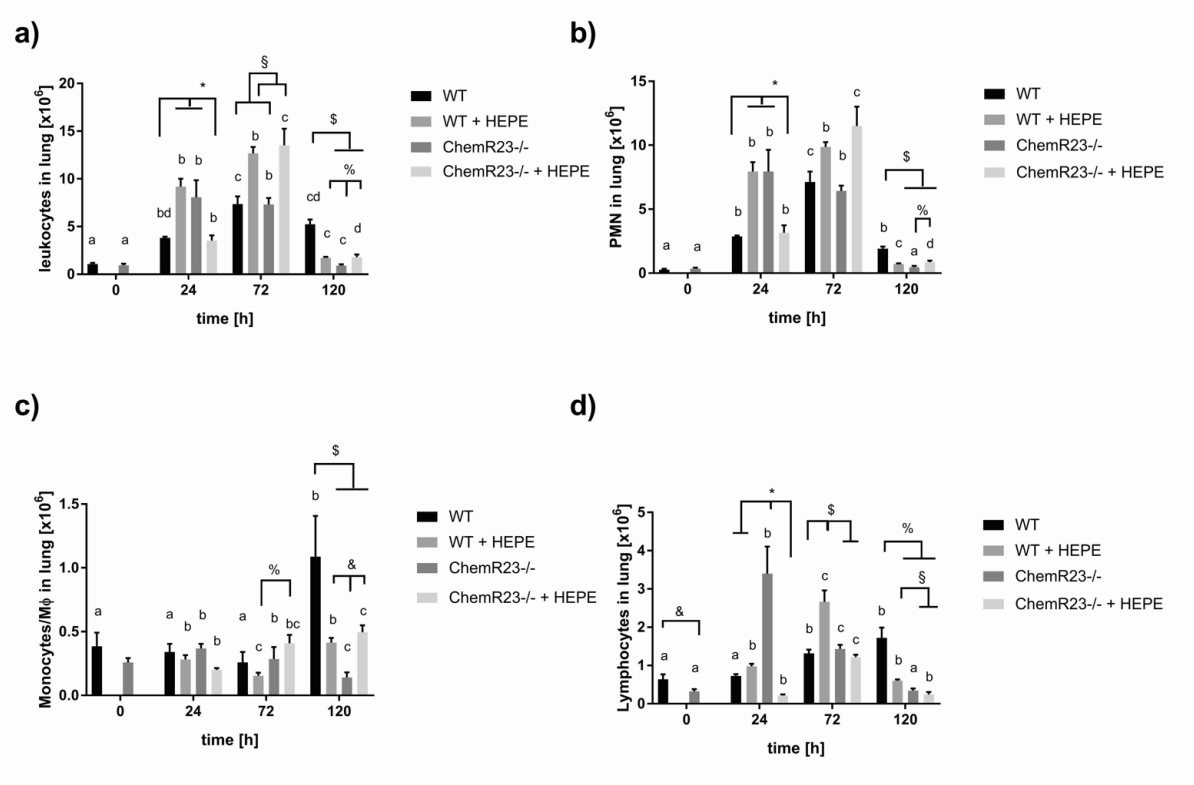

Abbildung 11: Gesamt-Leukozyten, PMN, Makrophagen/Monozyten und Lymphozyten nach LPS-Stimulation im Lungenhomogenat

In der Lunge wirken sich ChemR23 -/- und die Gabe der Resolvin-Vorstufe 18R-HEPE (Abk: HEPE) auf die Rekrutierung der unterschiedlichen Leukozytengruppen auf verschiedene Weise aus. In der WT-Gruppe ist die PMN-Rekrutierung innerhalb der ersten 72 Stunden deutlich geringer als im Vergleich zu den anderen Gruppen, die M/M Mobilisierung nach 120 Stunden hingegen am stärksten. Die Lymphozyten zeigen ein heterogenes Bild in den unterschiedlichen Gruppen. Dargestellt ist die durch FACS ermittelte Anzahl der Leukozyten (**a**), polymorphkernige Granulozyten (PMN) (**b**), Monozyten/Makrophagen (M/M) (**c**) und Lymphozyten (**d**) pro Milliliter Lungenhomogenat gewonnen aus 18R-HEPE-behandelten und nicht-behandelten WT und ChemR23 -/- Mäusen. Die Entnahme erfolgte 0, 24, 72 und 120 Stunden nach LPS-Behandlung.

Gezeigt werden die Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM), n = 2-5. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zum jeweiligen Zeitpunkt. Nur p-Werte < 0,05 wurden gekennzeichnet.

3.1.2.4 Vergleich der Verteilungsmuster der leukozytären Subpopulationen im Lungenhomogenat im Zeitverlauf nach LPS- und 18R-HEPE-Behandlung

Bei dem Vergleich der verschiedenen Leukozyten-Populationen (Anteil der Monozyten/Makrophagen, der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten an den Gesamtleukozyten) konnte man in den Tierversuchsgruppen (WT vs. WT+18R-HEPE vs. ChemR23 -/- vs. ChemR23-KO + 18R-HEPE) Unterschiede feststellen.

Ohne LPS-Stimulation waren beim unbehandelten WT überwiegend Lymphozyten mit 49,3 % in der gesamten Zellsuspension vertreten. Die übrigen Fraktionen, bestehend aus PMN und M/M, zeigten einen prozentualen Anteil an den Gesamtleukozyten von jeweils 21 % bzw. 29,7 %. In den folgenden 24 Stunden veränderte sich das Verteilungsmuster. Es kam zu einem deutlichen Rückgang der Lymphozyten auf 15,6 %. Der M/M Anteil schrumpfte auf 7,3 % und lediglich in der Fraktion der neutrophilen Granulozyten kam es zu einem erheblichen Anstieg auf 77,1 %. Diese Verteilung der Subpopulationen, gemessen an der Gesamtleukozytenzahl, blieb bis zum 72-stündigen Zeitpunkt annährend konstant. Am Ende der Messreihe kam es zu einem Wechsel. Die PMN-Fraktion sank auf 36,3 %, der M/M Anteil stieg um das Achtfache auf 24,7 % und die Lymphozytengruppe sogar auf 39 % (s. Abbildung 12 a).

Im Vergleich zum unbehandelten WT sah das prozentuale Verteilungsmuster bei den mit 18R-HEPE-behandelten Mäusen ähnlich aus. So präsentierte sich im Lungenhomogenat nach 24-stündiger LPS-Stimulation und 18R-HEPE-Gabe ebenfalls eine Prominenz an neutrophilen Granulozyten (86,3 %). Im Gegensatz zur WT-Kontrollgruppe stieg ihr Wert jedoch nicht weiter an. Ebenso wie in der unbehandelten WT-Gruppe waren die M/M mit weniger als 10 % in den nachfolgenden 72 Stunden die kleinste Fraktion unter den Leukozytenpopulationen. Zum sichtbaren M/M Anstieg kam es allerdings nach fünf Tagen (auf 24%). Bei den Lymphozyten konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Verteilungsmusters zwischen den beiden untersuchten WT-Gruppen beobachtet werden (s. Abbildung 12 b).

Bei den unbehandelten ChemR23 -/- Mäusen zeigten sich zum Zeitpunkt 0h die folgende Leukozyten-Verteilung: 38,2 % Granulozyten, 27,5 % Makrophagen/Monozyten und 34, 3 % Lymphozyten (s. Abbildung 12 c). Bei den darauffolgenden Messungen änderte sich der prozentuale Anteil der Fraktionen deutlich. Es kam innerhalb von 72 Stunden zu einem ausgeprägten Anstieg des PMN-Anteils im Lungenhomogenat (78,9 %). Gleichermaßen sanken die Fraktionen der M/M und Lymphozyten. Besonders der

prozentuale Anteil der M/M zeigte einen enormen Abfall auf 3,5 %. Zu diesem Zeitpunkt erreichten die Lymphozyten ebenfalls einen minimalen Wert von 17,6 %. In den folgenden 48 Stunden fand eine annährend gleiche Rekonstitution der Leukozytensubpopulationen zum Ausgangswert statt (s. Abbildung 12 c).

Nach 24-stündiger LPS und 18R-HEPE-Einwirkung befanden sich im Lungenhomogenat der ChemR23 -/- Mäuse 87,8 % Granulozyten, 5,6 % Makrophagen/Monozyten und 6,6 % Lymphozyten (s. Abbildung 12 d). Die anteilsmäßige Zusammensetzung der jeweiligen Subtypen unterschied sich damit von der unbehandelten ChemR23-Gruppe. So war der Prozentsatz der Lymphozyten nach 18R-HEPE-Behandlung deutlich niedriger, während der Anteil der neutrophilen Granulozyten um das 4-fache erhöht war. Die M/M waren im Vergleich zu den anderen Leukozytensubtypen am geringsten vertreten und hatten eine ähnliche Verteilung wie die unbehandelten ChemR23 -/- Mäuse. Nach fünf Tagen zeigte sich bei den 18R-HEPE-behandelten KO-Mäusen ein auffälliger Unterschied. Die PMN-Fraktion sank auf 47,7 % der Zellen, vergleichbar mit der unbehandelten ChemR23 -/- Gruppe, der M/M-Anteil hingegen lag mit 27,5 % deutlich oberhalb des Ausgangswerts der Vergleichsgruppe und die Anzahl der Lymphozyten waren mit etwa 12 % deutlich geringer.

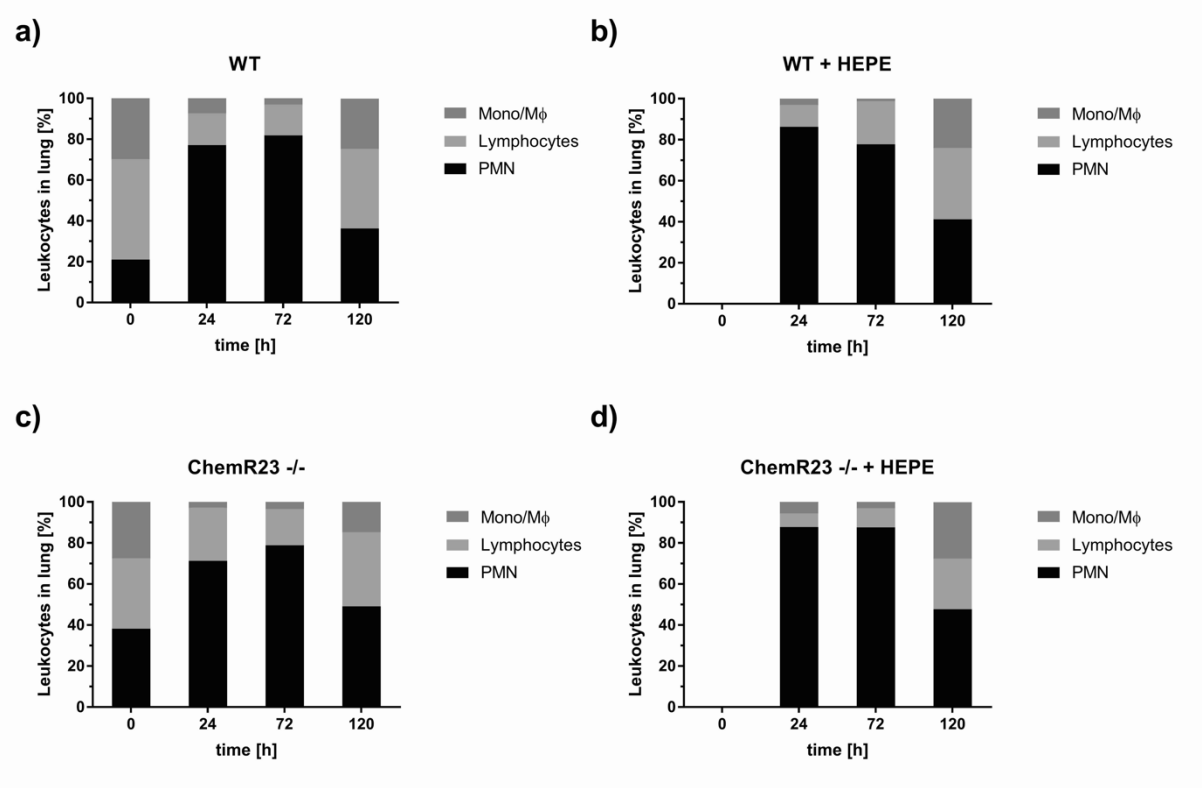

Abbildung 12: Verteilungsmuster der leukozytären Populationen in der Lunge

In Abwesenheit des ChemR23-Rezeptors kommt es zu einem veränderten prozentualen Verteilungsmuster der verschiedenen Leukozyten im Lungengewebe, eine Rekrutierung nach LPS-Stimulation bleibt nicht aus. Die Gabe von 18R-HEPE (Abk: HEPE) beeinflusst kaum die anteilsmäßige Rekrutierung der Leukozyten im Lungenhomogenat.

Dargestellt ist die durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Verteilung der Leukozytensubpopulationen in den Vergleichsgruppen WT (**a**), WT + 18R-HEPE (**b**), ChemR23 -/- (**c**) und ChemR23 -/- + 18R-HEPE (**d**) pro Milliliter Lungenhomogenat. Die Entnahme erfolgte 0, 24, 72 und 120 Stunden nach LPS-Behandlung.

3.1.3 Gesamtzahl der Leukozyten in der BAL nach LPS- und 18R-HEPE-Behandlung

In der aus dem Wildtyp gewonnenen bronchoalveolären Lavage (BAL) wurde ohne 18R-HEPE- und LPS-Intervention eine Leukozytenzahl von 0,09 ± 0,02 x 10^6 Zellen (n=4) zum Zeitpunkt 0 Stunden (*base line*) ermittelt. 24 Stunden nach der LPS-Applikation kam es zu einem 17-fachen Anstieg ($p < 0,05$) auf 1,6 ± 0,26 x 10^6 Leukozyten (n=3) (Abbildung 13 a). In der 18R-HEPE-behandelten WT-Gruppe kam es zu einem ähnlichen Anstieg (1,5 ± 0,2 x 10^6 Zellen (n=4)) (Abbildung 13 a). Die maximale Zellzahl wurde in beiden WT-Linien nach weiteren 48 Stunden erreicht. Bei den nicht mit 18R-HEPE behandelten WT-Tieren lag die ermittelte Leukozytenzahl bei 2,3 ± 0,3 x10^6 (n=3), bei den behandelten Mäusen bei 3,7 ± 0,3 x 10^6 (n=4) (Abbildung 13 a). Bis zum 120-stündigen Endmesszeitpunkt erfolgte ein deutlicher Rückgang der Zellzahl in der BAL. So konnten bei den WT-Mäusen 0,97 ± 0,1 x 10^6 Zellen (n=4) ermittelt werden, was einen Rückgang um das 2,5-fache bedeutete ($p < 0,05$) (Abbildung 13 a). Eine größere Abnahme wurde allerdings bei den 18R-HEPE-Tieren beobachtet. Hier zeigte sich eine 6-fache Verringerung zum Endzeitpunkt ($p < 0,05$).

Wie im Lungenhomogenat wurde die Leukozytenzahl auch in der bronchoalveolären Lavage der ChemR23 -/- Mausgruppe ermittelt. So konnte ohne LPS-Stimulation ein Ausgangswert von 0,02 ± 0,003 x 10^6 Zellen (n=4) zum Zeitpunkt 0h bestimmt werden, der signifikant unter dem Wert der WT-Vergleichsgruppe ($p < 0,05$) lag (Abbildung 13 a). In den ersten 24 Stunden nach der LPS-Stimulation kam es wie bei den WT-Mäusen zu einer deutlichen Leukozytenbewegung in den Alveolarraum ($p < 0,05$) (1,4 ± 0,2 x 10^6 Zellen (n=4)). Der Höhepunkt der Migration wurde bei den ChemR23 -/- Tieren zum 72-stündigen Zeitpunkt mit 3,6 ± 0,3 x 10^6 Zellen (n=4) erreicht, was einem signifikanten Anstieg um das 2,5-fache entspricht ($p < 0,05$) (Abbildung 13 a). Im Laufe der darauffolgenden 48 Stunden zeigte sich wie in den anderen Versuchsgruppen eine klare Abnahme der Leukozytenzahl. Der in der BAL ermittelte Wert lag am Ende der Messreihe bei 0,3 ± 0,07 x 10^6 Zellen (n=4), was einen Abfall der Zellzahl um das 12-fache bedeutet ($p < 0,05$). Zudem lag dieser Wert signifikant unter dem der beiden WT-Gruppen (18R-HEPE-behandelt, -unbehandelt) ($p < 0,05$).

In den ChemR23 -/- Mäusen zeigte sich nach 24-stündiger LPS-Instillation und 18R-HEPE- Injektion eine Zellzahl von 1,6 ± 0,4 x10^6 Leukozyten (n=4) (Abbildung 13 a). Dieser Wert unterschied sich nicht von dem der anderen untersuchten Gruppen. Die

folgenden 48 Stunden zeigten eine leicht erhöhte Leukozytentransmigration in die BAL. Der Maximalwert der Leukozytenanzahl (n=4) lag jedoch signifikant unterhalb der unbehandelten ChemR23 -/- Reihe und behandelten WT-Linie ($p < 0,05$). Nach 120-stündiger LPS- und 18R-HEPE- Intervention kam es zu einem dreifachen Rückgang der Immunzellen in der behandelten ChemR23 -/- Gruppe ($p < 0,05$). Mit $0,7 \pm 0,1 \times 10^6$ Zellen war dieser Wert jedoch doppelt so hoch als der Endwert der unbehandelten ChemR23 -/- Vergleichsgruppe ($p < 0,05$).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass es in einem Zeitraum von 24h bis 72h nach LPS-Stimulation in allen Versuchsgruppen zu einer verstärkten Leukozytentransmigration in den Alveolarraum kam. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den ersten 24 Stunden festgestellt werden. Die WT- und ChemR23 -/- Mäuse (behandelt/unbehandelt) hatten ihre Maxima an Leukozyten zum 72-stündigen Messzeitpunkt, wobei die 18R-HEPE-behandelte WT- und ChemR23 -/- Gruppe eine höhere Zellzahl aufwies. Ein deutlicher Leukozytenrückgang erfolgte in allen Mausreihen nach weiteren 48 Stunden, die unbehandelte WT-Gruppe hingegen zeigte zum 120-stündigen Endmesspunkt die höchste Leukozytenzahl in der BAL auf.

3.1.4 Auswirkung von LPS und 18R-HEPE auf die verschiedenen leukozytären Subpopulationen in der BAL

3.1.4.1 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

In der 18R-HEPE-unbehandelten WT-Gruppe betrug die Anzahl der PMN zum Zeitpunkt 0h 1467 ± 673 Zellen (n=4). Nach LPS-Instillation kam es innerhalb von 24 Stunden erwartungsgemäß zu einer massiven Zunahme der in der BAL gemessenen PMN-Population ($1,5 \pm 0,25 \times 10^6$ PMN (n=3)) (Abbildung 13 b). Das entsprach einem Anstieg um mehr als das 1000-fache und erwies sich als signifikant ($p < 0,05$). In den darauffolgenden 48 Stunden stagnierte sie Zellmigration und befand sich zum 72-stündigen Messzeitpunkt bei $1,7 \pm 0,24 \times 10^6$ Zellen (n=4). Ein im zeitlichen Verlauf statistisch relevanter Unterschied ereignete sich in den nächsten zwei Tagen. Es zeigte

sich ein 8,5-facher Rückgang ($p < 0,05$) auf 0,2 ± 0,04 x 10^6 der Granulozyten (n=4) (Abbildung 13 b).

Die geringste Zellzahl konnte zum Zeitpunkt 0 Stunden in der Gruppe der ChemR23 -/- Mäuse mit 29 ± 17 neutrophilen Granulozyten (n=3) beobachtet werden (nicht signifikant). Wie in der unbehandelten WT-Vergleichsgruppe zeigten sich bei den LPS erkrankten KO-Mäusen nach 24 Stunden eine erhebliche PMN-Transmigration in die BAL ($p < 0,05$) (s. Abbildung 13 b). Mit einer Anzahl von 1,4 ± 0,16 x 10^6 PMN (n=4) konnte zudem ein ähnlich hohes Zellniveau erreicht werden. Im Gegensatz zum WT zeigte sich jedoch in den folgenden Tagen in dieser Gruppe ein deutlicher Unterschied. Statt Stagnation kam es zum 72-stündigen Messpunkt zu einem 2,3-fachen Zellzahlanstieg ($p < 0,05$). Dieses Maximum mit 3,3 ± 0,24 x 10^6 PMN lag doppelt so hoch wie der 72-Stunden Wert in der WT-Gruppe ($p < 0,05$). Innerhalb der nächsten 48 Stunden kam es wie bei den WT-Mäusen zu einer erheblichen Dezimierung der Zellpopulation. So konnte mit 0,3 ± 0,07 x 10^6 neutrophilen Granulozyten (n=4) ein 13-facher Abfall in der BAL beobachtet werden ($p < 0,05$ (Abbildung 13 b).

Bei den mit 18R-HEPE-behandelten WT-Mäusen konnte nach 24 Stunden eine neutrophile Zellzahl von 1,4 ± 0,2 x 10^6 gemessen werden. Bei den KO-Tieren lag die Population bei 1,6 ± 0,4 x 10^6 Zellen (Abbildung 13 b). Wie auch in der unbehandelten KO-Vergleichsgruppe zeigten sich im Laufe von 48 Stunden ebenfalls signifikante Anstiege innerhalb der 18R-HEPE-Untersuchungsgruppen (WT/ChemR23). Allerdings lagen die Maxima deutlich unter dem Wert der nicht behandelten ChemR23 Linie ($p < 0,05$). Wie in den beiden unbehandelten Gruppen zuvor kam es auch bei den 18R-HEPE-Mäusen in den darauffolgenden 48 Stunden zu einem ausgeprägten PMN-Rückgang in der BAL. So zeigte sich am Ende der Versuchsreihe (nach 120 Stunden) in der 18R-HEPE-WT-Gruppe eine Anzahl von 0,23 ± 0,04 x 10^6 PMN (n=4) und 0,28 ± 0,07 x 10^6 in dem ChemR23-KO (n=4) (Abbildung 13 b).

3.1.4.2 Monozyten/Makrophagen (M/M)

Die vor LPS-Stimulation gemessene Anzahl an Monozyten/Makrophagen (M/M) in der BAL lag zum Zeitpunkt 0 Stunden in der unbehandelten WT-Gruppe bei 0,09 ± 0,01 x 10^6 Zellen (n=4) (s. Abbildung 13 c). In den darauffolgenden 72 Stunden zeigte sich bei den Mäusen keine statistisch relevante Zellzahlveränderung. Allerdings konnte innerhalb der darauffolgenden 48 Stunden eine deutliche M/M-Transmigration in die BAL

beobachtet werden ($p < 0,05$). Die Zellzahl verachtfachte sich im Vergleich zum 72h-Wert auf 0,58 ± 0,06 x 10^6 M/M (n=4) und lag damit deutlich über den Werten der anderen Gruppen zu diesem Zeitpunkt. Der *base line* Wert (0 Stunden) lag in der ChemR23 -/- Gruppe bei 0,02 ± 0,003 x 10^6 Zellen (n=4) und befand sich damit signifikant unter dem Ausgangswert der WT-Vergleichsgruppe ($p < 0,05$) (Abbildung 13 c). In den nachfolgenden 5 Tagen konnte kein ausgeprägtes Migrationsverhalten beobachtet werden. Die im zeitlichen Verlauf ermittelten Werte lagen mehrheitlich signifikant unter denen der Vergleichsgruppen. Der einzig statistisch auffällige M/M-Anstieg fand zwischen dem 24- und dem 72-stündigen Messzeitpunkt statt ($p < 0,05$). In diesem Zeitraum verdoppelte sich die Anzahl der Makrophagen/Monozyten. Das Maximum wurde mit 0,07 ± 0,01 x 10^6 Zellen (n=4) nach 120 Stunden erreicht und war damit 3-mal höher als der eigene Ausgangswert, allerdings um das 8-fache niedriger als zur WT-Vergleichsgruppe.

Die mit 18R-HEPE-behandelte WT- und KO-Gruppe zeigte nach 24-stündiger LPS-Inkubation ein ähnliches Zellzahlniveau wie die unbehandelte WT-Vergleichsreihe (0,06 ± 0,007 x 10^6 M/M (n=4) und 0,08 ± 0,03 x 10^6 Zellen bei den KO-Mäusen (n=3)) (Abbildung 13 c). Allerdings konnte ein deutlicher Unterschied zur unbehandelten ChemR23-KO-Gruppe festgestellt werden ($p < 0,05$). Innerhalb der folgenden 48 Stunden kam es in beiden behandelten Gruppen zu einer ausgeprägten M/M-Bewegung in den Alveolarraum. Die zum 72-stündigen Zeitpunkt ermittelte M/M-Zellzahl hatte sich in der 18R-HEPE-WT-Gruppe zum Vorwert mehr als verdoppelt ($p < 0,05$), in der behandelten KO-Gruppe sogar mehr als verdreifacht ($p < 0,05$). Die erfassten phagozytären Zellen aller Gruppen unterschieden sich zu diesem Zeitpunkt signifikant voneinander. Das Zellmaximum wurde in beiden behandelten Klassen am Ende der Analyse (nach 120 Stunden) mit 0,33 ± 0,04 x 10^6 M/M (n=4) in der KO-Reihe und mit 0,18 ± 0,01 x 10^6 Zellen (n=4) in der WT-Gruppe festgestellt.

3.1.4.3 Lymphozyten

Neben PMN und M/M wurde ebenfalls das Migrationsverhalten der Lymphozyten im zeitlichen Verlauf in der bronchoalveolären Lavage untersucht.

Der Ausgangswert der LPS-unstimulierten WT-Gruppe lag bei 1143 ± 287 Zellen (n=4) (Zeitpunkt 0h). 24 Stunden nach intratrachealer Endotoxinapplikation folgte ein Anstieg der Zellzahl auf 0,03 ± 0,007 x10^6 (n=3) (Abbildung 13 d). Das absolute Maximum

konnte nach weiteren 48 Stunden mit einer Verachtfachung der Lymphozytenzahl beobachtet werden ($p < 0,05$). Im Anschluss kam es zu einem geringfügigen Abfall der zuvor gemessenen Zellzahl. So konnte am Ende der Versuchsreihe eine Anzahl von 0,18 ± 0,04 x 10^6 Lymphozyten (n=4) ermittelt werden (Abbildung 13 d).

Im Vergleich zum unbehandelten WT zeigten sich bei den unbehandelten ChemR23 -/- Mäusen im zeitlichen Verlauf durchgehend signifikante Unterschiede ($p <0,05$). Der Ausgangswert entsprach dem des Wildtyps. Nach LPS-Applikation folgte, wie in den anderen Gruppen auch, eine erhöhte Lymphozytenbewegung in die BAL. Allerdings befanden sich in der Lavage der unbehandelten ChemR23-KO-Mäuse nach 24 Stunden mit 5420 ± 731 Lymphozyten (n=4) fünfmal weniger Zellen als in der WT-Vergleichsgruppe ($p < 0,05$) (Abbildung 13 d). Eine deutliche Zellmigration erfolgte in den folgenden 48 Stunden zum 72-stündigen Messzeitpunkt. Es kam zu einem 24-fachen Anstieg auf 0,13 ± 0,01 x10^6 Lymphozyten (n=4) gefolgt von einem 48-stündigen Abfall auf 0,02 ± 0,003 x 10^6 Zellen (zehnmal niedriger als der Endwert in der WT-Gruppe).

Im Vergleich zu der unbehandelten WT-Gruppe zeigte sich nach 24-stündiger LPS- und 18R-HEPE-Applikation bei den WT-Mäusen kein wesentlicher Unterschied in der Lymphozytenpopulation (n=4) (Abbildung 13 d). Eine ausgeprägte Abweichung ($p < 0,05$) konnte erst im weiteren Zeitverlauf beobachtet werden. Es kam bei dem mit 18R-HEPE- behandelten Wildtyp innerhalb von 48 Stunden zur auffälligen Zellmigration in den Alveolarraum. Mit einer Anzahl von 0,7 ± 0,11 x 10^6 Lymphozyten (n=3) stieg der Anteil zum Vorwert um das 33-fache und lag damit dreimal so hoch wie der Wert der WT-Vergleichsgruppe (Abbildung 13 d). Am Ende der Messreihe (nach 120 Stunden) wurden bei den 18R-HEPE-behandelten WT-Mäusen 0,25 ± 0,03 x 10^6 Lymphozyten ermittelt. Mit diesem Endwert präsentierten sie sich als die zellstärkste Fraktion unter allen Vergleichsgruppen zu diesem Zeitpunkt.

Die geringste Lymphozytenzahl lag nach 24 Stunden unter allen Vergleichsreihen in der behandelten ChemR23 -/- Gruppe mit 2195 ± 256 Zellen (n=3). Darauffolgend konnte zwar ein signifikanter Anstieg auf 0,05 ± 0,006 x10^6 Zellen (n=3) zum Vorwert ermittelt werden, allerdings befand sich dieser weit unter den Zellzahlen der anderen untersuchten Gruppen. Zum 120-stündigen Zeitpunkt kam es zu einem vierfachen Abfall der Lymphozytenzahl. Dieser erwies sich als deutlich signifikant im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Letztlich konnte beobachtet werden, dass unter 18R-HEPE-Einfluss die Lymphozytenzahl in der WT-Gruppe im zeitlichen Verlauf signifikant höher lag als in den KO-Gruppen.

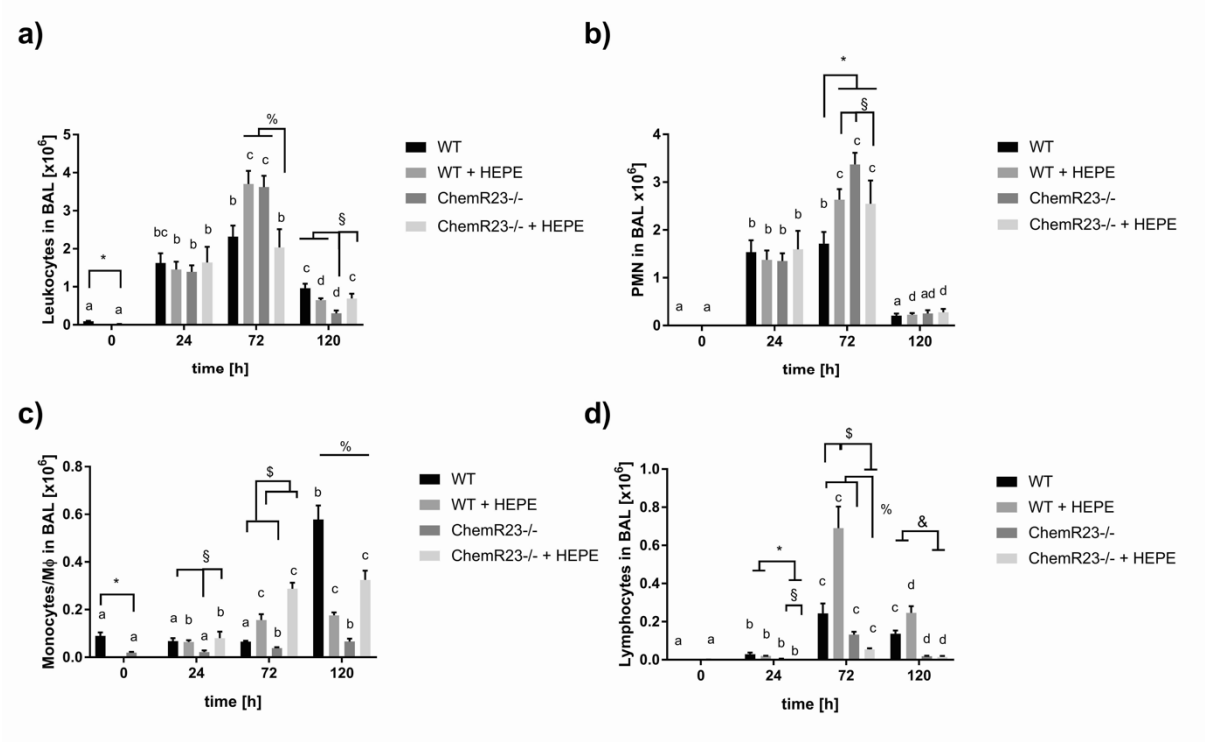

Abbildung 13: Differentialzellbild der Leukozyten in Mio/ml in der BAL

Der ChemR23-KO (ChemR23 -/-) reduzierte die Anzahl rekrutierter Makrophagen, erhöhte jedoch die der PMN und Lymphozyten. Die Wirkung von 18R-HEPE (Abk. HEPE) war abhängig vom betrachteten Zelltyp. Dargestellt ist die durch FACS ermittelte Anzahl der Leukozyten (a), polymorphkernige Granulozyten (PMN) (b), Monozyten/Makrophagen (M/M) (c) und Lymphozyten (d) pro Milliliter BAL (gewonnen aus 18R-HEPE-behandelten und nicht-behandelten WT und ChemR23 -/- Mäusen). Die Entnahme erfolgte 0, 24, 72 und 120 Stunden nach LPS-Behandlung. Gezeigt werden die Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM), n = 2-5. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten. Nur p-Werte < 0,05 wurden gekennzeichnet.

3.1.5 Vergleich der Verteilungsmuster der leukozytären Subpopulationen in der BAL im Zeitverlauf nach LPS- und 18R-HEPE-Behandlung

Um sich das Verteilungsmuster der Leukozytensubtypen innerhalb der Mausgruppen über den 120-stündigen Zeitverlauf anzuschauen, wurde der prozentuale Anteil der PMN, M/M, Lymphozyten zu den jeweiligen Messzeitpunkten (0, 24 h, 72 h und 120 h) bestimmt. Zum *base line* Zeitpunkt 0 Stunden zeigte sich in der unbehandelten WT-Gruppe ein deutliches Verteilungsmuster mit einer M/M-Prominenz von 97%. Der Anteil der PMN und Lymphozyten lag erheblich unter dem Wert der M/M mit 2% bzw. 1%. Eine ausgeprägte Zelländerung ereignete sich nach LPS-Instillation. In der BAL kam es innerhalb von 24 Stunden zu einer auffälligen PMN-Migration (94% der Leukozyten) und einem starken Rückgang der M/M auf 4%. Der Anteil der Lymphozyten blieb konstant. Allerdings konnte bei den Lymphozyten in den nachfolgenden 96 Stunden eine stetige Zunahme beobachtet werden. So zeigte sich am Ende der Messreihe ein prozentualer Lymphozyten-Anteil von 18%. Zudem stellte sich eine erneute Umkehr ein, der Anteil der M/M stieg auf 60%, während der PMN-Anteil auf 22% absank (Abbildung 14 a).

Im Vergleich zu den unbehandelten WT-Mäusen zeigten sich anfänglich keine wesentlichen Unterschiede zu den mit 18R-HEPE-injizierten WT-Mäusen. Nach erfolgter LPS-Stimulation reduzierte sich die Anzahl der M/M in der BAL innerhalb von 24 Stunden auf unter 5%, während die Summe der PMN anstieg (> 90%). Der lymphozytäre Anteil blieb konstant bei ca. 1%. Allerdings konnte im Vergleich zu den unbehandelten WT-Tieren im zeitlichen Verlauf eine Zunahme beobachtet werden. In der 18R-HEPE-Versuchsgruppe stieg der Anteil der Lymphozyten im zeitlichen Verlauf auf 38% und war nach 120 Stunden doppelt so hoch wie in der Vergleichsgruppe. Auch innerhalb der M/M-Fraktion zeigte sich zum Schluss ein auffallender Unterschied zur unbehandelten WT-Kontrollgruppe. So waren lediglich 27% der Phagozyten nach 120 Stunden in der BAL vertreten, die Hälfte weniger als in der WT-Gruppe. In der mit 18R-HEPE-behandelten WT-Mausgruppe zeigte sich anfänglich, ähnlich der unbehandelten WT-Reihe, mit 94% Zellen eine starke PMN-Präsenz im Alveolarraum. Am Ende der Versuchsreihe lag jedoch der neutrophile Anteil um das 1,5-fache höher (35%) (Abbildung 14 b).

Im direkten Vergleich wurden ebenfalls die Lavagen der unbehandelten ChemR23 -/- Mäuse hinsichtlich der Leukozytendifferenzierung untersucht. Es zeigte sich, dass die

unstimulierten Tiere ähnliche Werte präsentierten wie die WT-Gruppe. Auch innerhalb der ersten 24 Stunden nach LPS-Stimulation konnten keine wesentlichen Unterschiede beobachtet werden. Es kam wie in der WT-Vergleichsgruppe zu einer ausgeprägten PMN-Migration bei gleichzeitigem M/M-Rückgang. Erst nach weiteren 48 Stunden veränderte sich das Verteilungsmuster zwischen KO- und unbehandelten WT-Mäusen. Es zeigte sich ein weiterhin konstant hoher PMN-Anteil (95%), der sich zum 120-stündigen Endmesspunkt lediglich um 20% reduzierte und nicht wie in der WT-Vergleichsreihe um 60%. Auch kam es bei den ChemR23-KO- Tieren zu einer langsameren phagozytären Rekonstitution. So zeigten sich am Ende gerade mal 20% M/M in der Lavage, das waren dreimal weniger als bei den WT-Mäusen (60%). Der lymphozytäre Anteil unterschied sich erst nach 72 Stunden deutlich von den Wildtypen. In der BAL der KO-Mäuse konnten über den gesamten Zeitverlauf nur weniger als 10% Lymphozyten beobachtet werden im Gegensatz zu den WT-Tieren, bei denen nach 72 Stunden der Anteil über 10% anstieg (Abbildung 14 c).

Wie in der unbehandelten KO-Kontrollgruppe zeigten sich auch in der mit 18R-HEPE-behandelten ChemR23 -/- Reihe keine wesentlichen Veränderungen hinsichtlich der lymphozytären Migration in der BAL. Der Anteil lag auch hier durchschnittlich unterhalb von 10%. Allerdings kam es in der 18R-HEPE-KO-Gruppe nach LPS-Stimulation zu einem höheren M/M-Anteil. So konnten nach 72 Stunden bereits 10% Phagozyten ermittelt werden. Dieser Wert lag um ein Vielfaches höher als in den anderen Gruppen. Der gemessene Endwert nach 120 Stunden lag mit 52% fast auf dem Niveau der unbehandelten WT-Gruppe und war zweimal höher als bei den unbehandelten ChemR23-KO-Mäusen. Hinsichtlich der neutrophilen Transmigration zeigten sich nach 72 Stunden keine deutlichen Unterschiede und waren annähernd gleich (etwa 90%). In Folge kam es allerdings in der behandelten ChemR23 -/- Reihe zu einem vergleichsweisen schnelleren PMN-Abfall auf 45%, das waren 30% weniger als zur KO-Kontrollgruppe, aber dennoch mehr als in den anderen Gruppen (Abbildung 14 d).

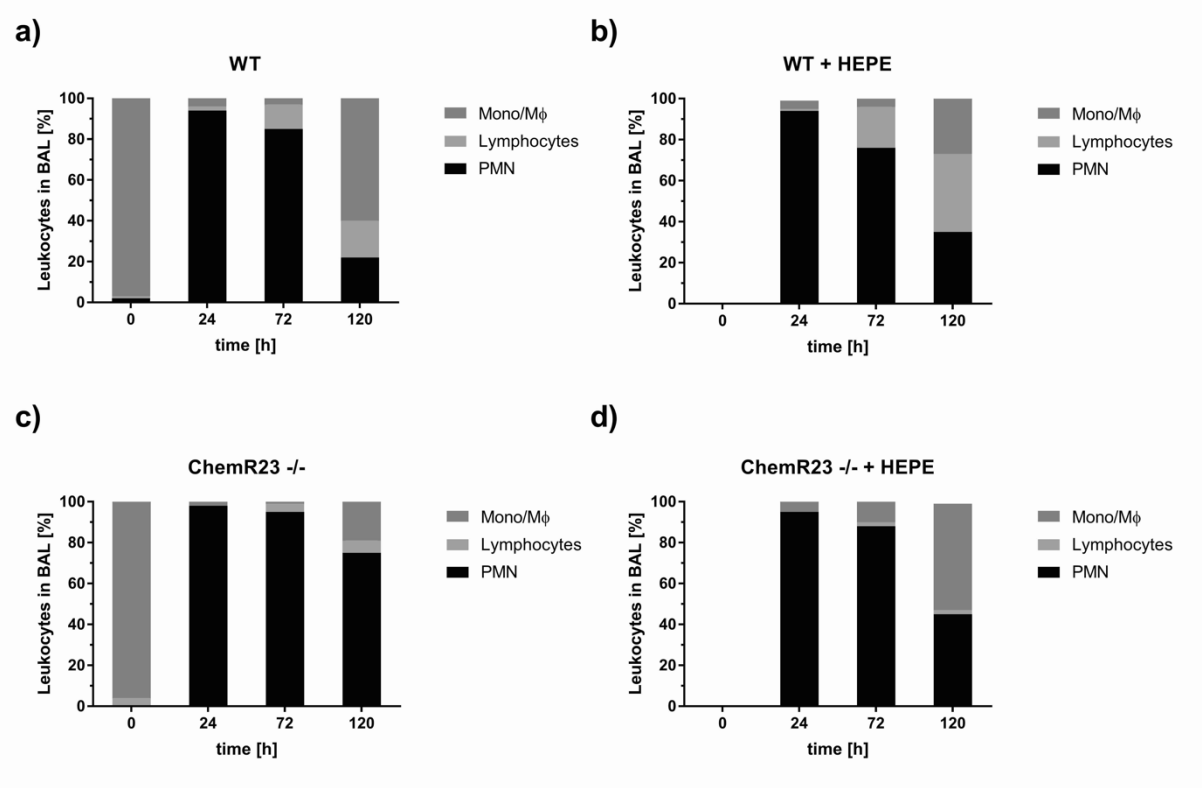

Abbildung 14: Verteilungsmuster der leukozytären Subpopulationen in der BAL im Zeitverlauf nach LPS- und 18R-HEPE (Abk: HEPE) Behandlung in Fraktionen in 100%

Makrophagen bilden sowohl im WT- als auch bei den ChemR23-KO-Mäusen den größten prozentualen Anteil der Leukozytenpopulation in der BAL aus. In den ChemR23-KO-Mäusen ist der prozentuale Anteil der in die BAL rekrutierten Lymphozyten nach LPS-Stimulation geringer als im WT. Dargestellt ist die durch FACS ermittelte prozentuale Verteilung der Leukozytensubpopulationen in den Vergleichsgruppen WT (**a**), WT + 18R-HEPE (**b**), ChemR23 -/- (**c**) und ChemR23 -/- + 18R-HEPE (**d**) pro Milliliter Lungenhomogenat, n = 2-5. Die Entnahme erfolgte 0, 24, 72 und 120 Stunden nach LPS-Behandlung.

3.2 Apoptose und Nekrose in der BAL

Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit wurden apoptotische und nekrotische Effekte untersucht, die bei den Leukozyten der jeweiligen Mausgruppen nach LPS-Behandlung und 18R-HEPE-Gabe auftraten.

3.3 Apoptose und Nekrose bei polymorphkernigen Granulozyten

3.3.1.1 Apoptose bei den PMN

In der unstimulierten WT-Gruppe lag der Apoptoseanteil in der BAL zum Zeitpunkt 0 Stunden unter den PMN bei 4,8 % (n=2). Der Gesamtanteil an apoptotischen PMN in der Lavage stieg in den darauffolgenden Stunden nach LPS-Applikation auf 6 %, das entsprach 0,09 ± 0,006 x 10^6 avitale Zellen und zum 120-stündigen Endmesspunkt auf 7,5 %, wenngleich die absolute Zellzahl an avitalen Granulozyten auf 0,02 ± 0,002 x 10^6 (n=3) sank (Abbildung 15 und 17).
Nach 24-stündiger LPS- und 18R-HEPE-Applikation zeigte sich im Vergleich zu der unbehandelten WT-Linie ein deutlicher Unterschied. Lediglich 1,9 % der Granulozyten zeigten sich apoptotisch, das waren 0,03 ± 0,002 x 10^6 avitale Zellen (n=4) ($p < 0,05$). Allerdings kam es in den darauffolgenden 48 Stunden zu einer beträchtlichen Zunahme an funktionslosen Zellen (0,13 ± 0,01 x 10^6; n=3). So konnten zum 72-stündigen Messzeitpunkt 4,8 % zugrunde gegangene PMN beobachtet werden ($p< 0,05$). Nach diesem klar erkennbaren Höhepunkt folgte eine deutliche Abnahme. Innerhalb von 48 Stunden sank der Anteil an apoptotischen Neutrophilen auf 3,7 % ab und befand sich damit um die Hälfte niedriger als der Endwert der unbehandelten WT-Vergleichsgruppe (Abbildung 15 und 17).

Die ChemR23 -/- Gruppe zeigte im Vergleich zu der unbehandelten WT-Linie bereits ohne LPS-Stimulation einen deutlich höheren Anteil an apoptotischen PMN (16,9 %). Allerdings lag die absolute Anzahl der apoptotischen Zellen deutlich unter dem Anfangswert der WT-Vergleichsgruppe ($p < 0,05$). Obwohl in den darauffolgenden 24 Stunden, nach LPS-Gabe, die apoptotische Fraktion der KO-Mäuse auf das Niveau der WT-Gruppe absank (6,7 %), stieg die avitale Zellzahl in der BAL auf 0,09 ± 0,006 x 10^6 (n=3) an. Die Apoptoserate hielt sich im Verlauf auf etwa 6 %, fiel dann allerdings zum Endmesspunkt nach 120 Stunden auf 1 % ab und zeigte mit 0,003 ± 0,0003 x 10^6

Granulozyten einen deutlichen Unterschied zu der WT-Vergleichsgruppe (n=3) ($p < 0,05$) (Abbildung 15 und 17).

Im zeitlichen Verlauf konnte in der mit 18R-HEPE-behandelten ChemR23 -/- Gruppe bei jedem Messpunkt ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) festgestellt werden. Der Anteil apoptotischer Granulozyten lag in dieser Gruppe nach LPS- und 18R-HEPE-Gabe zum 24-stündigen Messzeitpunkt bei 2,3 % Zellen und entsprach einer Anzahl von $0,04 \pm 0,01 \times 10^6$ zugrunde gegangener PMN (n=3). Der ermittelte Wert zeigte sich damit niedriger als in der unbehandelten ChemR23 -/- und WT-Gruppe ($p < 0,05$). In den nachfolgenden 48 Stunden kam es allerdings zu einem erheblichen Anstieg an apoptotischen PMN in der Lavage. Mit 9,4 % wurde das Maximum in der 18R-HEPE-behandelten ChemR23 -/- Gruppe erreicht und befand sich zudem mit $0,24 \pm 0,02 \times 10^6$ avitalen Granulozyten (n=4) deutlich über dem Vergleichswert der unbehandelten WT-Gruppe ($p < 0,05$). Am Ende der Messreihe nach 120 Stunden kam es zu einem Rückgang auf 8 %, das entsprach $0,02 \pm 0,005 \times 10^6$ (n=3) PMN (Abbildung 15 und 17).

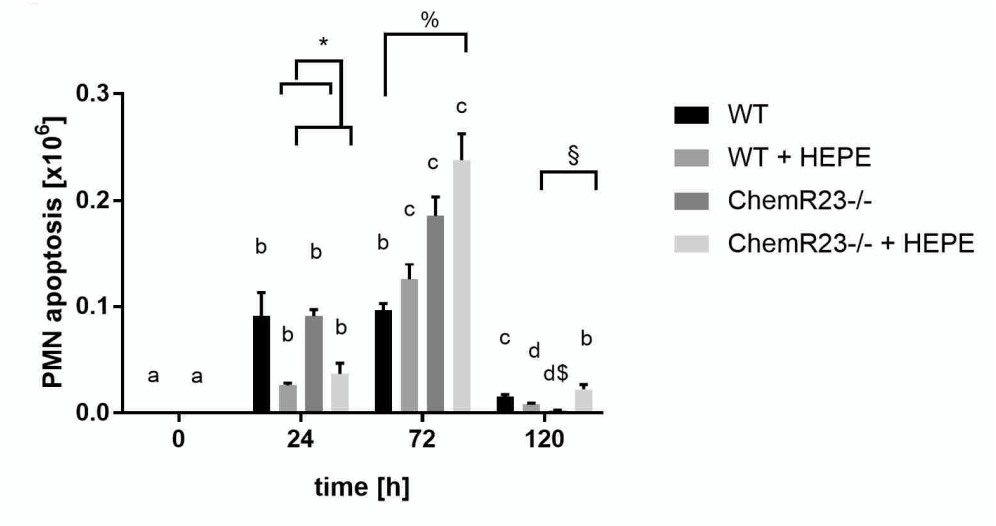

Abbildung 15: Apoptose der polymorphkernigen Granulozyten (PMN) in Mio/ml BAL

Die Apoptose der PMN zeigt zwischen den einzelnen Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf ein heterogenes Bild. Gemein ist den Gruppen der deutliche Anstieg an apoptotischen Zellen nach 72 Stunden und deren Rückgang nach 120 Stunden. Der Einfluss von 18R-HEPE (Abk: HEPE) auf WT und ChemR23 -/- ist besonders nach 24 Stunden zu erkennen.

Dargestellt ist die durch FACS ermittelte Anzahl der apoptotischen PMN pro Milliliter BAL (gewonnen aus 18R-HEPE-behandelten und nicht-behandelten WT- und ChemR23 -/- Mäusen). Die Entnahme erfolgte 0, 24, 72 und 120 Stunden nach LPS-Behandlung. Gezeigt werden die Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM), n = 2-5. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede der einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf. Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten. Nur p-Werte < 0,05 wurden gekennzeichnet.

3.3.1.2 Nekrose bei den PMN

Der Nekroseanteil unter den Gesamtgranulozyten der jeweiligen Mausgruppen lag durchgehend unterhalb der Apoptosefraktion. Innerhalb von 72 Stunden nach LPS-Applikation kam es in allen Gruppen zu einem verstärkten Untergang an Granulozyten. Auffällig zeigte sich der erhöhte Anteil nekrotischer PMN ohne vorherige LPS-Stimulation. In der unbehandelten WT-Gruppe betrug dieses Verhältnis 1,4 % und in der ChemR23 -/- Gruppe 9,2 %. Der Anteil nekrotischer PMN fiel bei den unbehandelten WT-Tieren in den darauffolgenden 24 Stunden auf 0,3 % ab und entsprach einer Anzahl von 0,005 ± 0,006 x 10^6 Zellen (n=4). Nach weiteren 48 Stunden kam es zu einem deutlich nekrotischen Verfall auf 2,1% mit 0,04 ± 0,005 x 10^6 PMN. Der größte Anteil zerfallener Zellen konnte nach 120 Stunden mit 2,6 % dokumentiert werden, wenngleich die Gesamtzahl nekrotischer Granulozyten zu diesem Zeitpunkt auf 0,006 ± 0,0009 x 10^6 (n=3) abgefallen war (Abbildung 16 und 17).

Im Vergleich zu den unbehandelten zeigte sich bei den 18R-HEPE-behandelten WT-Mäusen ein anderes Bild. Nach 24-stündiger 18R-HEPE- und LPS-Applikation lag der Anteil nekrotischer Granulozyten bei 0,9 % (0,01 ± 0,002 x 10^6 PMN) (Abbildung 16 und 17). In den darauffolgenden 48 Stunden kam es zu einer Steigerung um 3,5 % auf 4,4 % und skizzierte mit 0,1 ± 0,007 x 10^6 nekrotischen Zellen den zeitlichen Höhepunkt in allen untersuchten Gruppen ($p < 0,05$). Der Endwert nach 120 Stunden lag bei 2,8 % Zellen und befand sich damit auf einem ähnlich niedrigen Niveau wie in der unbehandelten WT-Mauslinie (0,006 ± 0,0006 x 10^6 zerstörte PMN; n=3), aber signifikant höher als in den ChemR23 -/- Gruppen ($p < 0,05$).

Der initiale nekrotische PMN-Anteil lag zum Zeitpunkt 0h in der ChemR23 -/- Gruppe bei 9,2 %, und befand sich damit deutlich höher als in der WT-Gruppe. Nach 24 Stunden zeichnete sich ein Abfall ab (Abbildung 17) und zeigte im Verlauf nur noch geringfügige Abweichungen zwischen 0,3 % und 0,6 %. Allerdings kam es gleichzeitig zu einer Zunahme an nekrotischen Zellen in der BAL. Das Maximum wurde nach 72 Stunden mit 0,02 ± 0,004 x 10^6 (n=3) nekrotischen PMN erreicht (Abbildung 16). Ähnliche Werte wurden auch bei den 18R-HEPE- behandelten KO-Mäusen beobachtet. Die Nekroserate lag in dieser Linie im zeitlichen Verlauf unter 1 % und zeigte keine deutlichen Unterschiede.

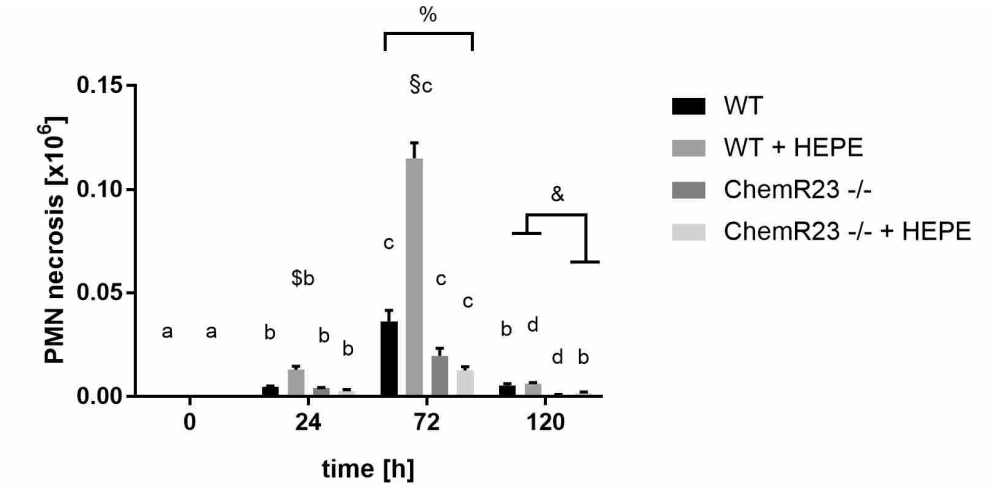

Abbildung 16: Nekrose der polymorphkernigen Granulozyten (PMN) in Mio/ml BAL

Die Nekroserate der PMN zeigt sich im Vergleich zu der apoptotischen Fraktion deutlich geringer. Es zeigt sich vor allem nach 72 Stunden in der mit 18R-HEPE (Abk: HEPE) behandelten WT-Gruppe ein signifikanter Unterschied zu den anderen Versuchstypen. Dargestellt ist die durch FACS ermittelte Anzahl der nekrotischen PMNs pro Milliliter BAL (gewonnen aus 18R-HEPE-behandelten und nicht-behandelten WT- und ChemR23 -/- Mäusen). Die Entnahme erfolgte 0, 24, 72 und 120 Stunden nach LPS-Behandlung. Gezeigt werden die Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM), n = 2-5. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten. Nur p-Werte < 0,05 wurden gekennzeichnet.

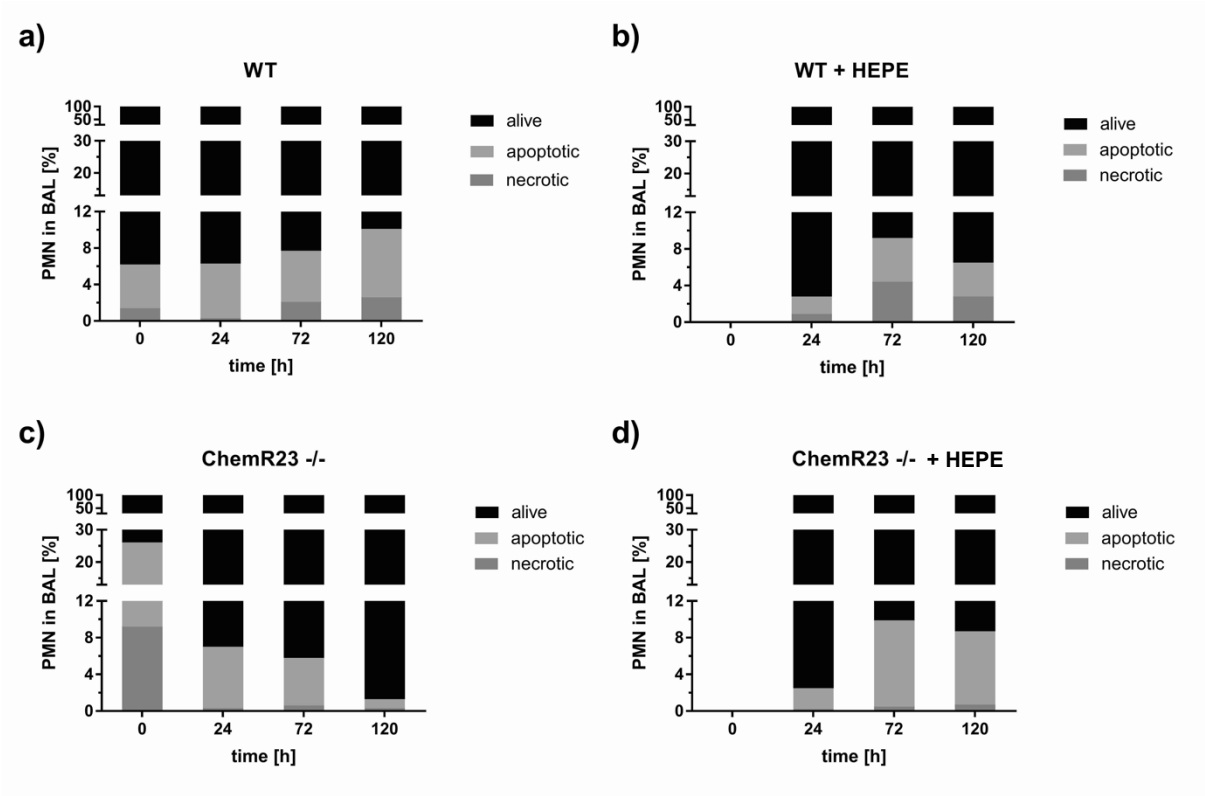

Abbildung 17: Verteilungsmuster apoptotischer, nekrotischer und vitaler PMN in der BAL im Zeitverlauf nach LPS- und 18R-HEPE- (Abk: HEPE) Behandlung in Fraktionen in 100%

Deutlich zu erkennen, ist der sehr geringe nekrotische Anteil nach 24h LPS-Instillation in beiden ChemR23 -/- Linien +/- 18R-HEPE. Auffällig ist ebenso die erhöhte Apoptoserate nach 72h in der ChemR23 -/- 18R-HEPE Gruppe. Dargestellt ist die durch FACS ermittelte prozentuale Verteilung der apoptotischen und nekrotischen PMN in den Vergleichsgruppen WT (a), WT + 18R-HEPE (b), ChemR23 -/- (c) und ChemR23 -/- + 18R-HEPE (d) pro Milliliter BAL, n = 2-5. Die Entnahme erfolgte 0, 24, 72 und 120 Stunden nach LPS-Behandlung.

3.3.2 Apoptose und Nekrose bei Monozyten und Makrophagen in der BAL

3.3.2.1 Apoptose bei Monozyten und Makrophagen

In der Gruppe der unbehandelten WT-Mäuse zeigten sich Unterschiede in der Anzahl apoptotischer M/M im zeitlichen Verlauf zwischen 0 und 120 Stunden (Abbildung 18). Der Anteil apoptotischer Zellen in der BAL lag bei den unstimulierten Tieren zum Zeitpunkt 0h bei 5,6 % mit 0,005 ± 0,0007 x 10^6 M/M (n=3). In den weiteren 24 Stunden nach LPS- Applikation stieg der Anteil auf 29 % an, das entsprach 0,02 ± 0,003 x 10^6 apoptotische Zellen (n=3). Im Verlauf kam es zu einem signifikanten Abfall auf 8 % mit 0,005 ± 0,0005 x 10^6 avitalen M/M ($p < 0,05$). Nach diesem fast vierfachen Rückgang folgte nach 120h ein fünffacher Anstieg auf 0,03 ± 0,004 x10^6 (n=4) Zellen (Abbildung 18 und 20).

Im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp zeigte der mit 18R-HEPE-behandelte WT zum Teil deutliche Unterschiede. So waren zum 24-stündigen Zeitpunkt 6-mal weniger apoptotische M/M vorhanden als in der WT-Vergleichsgruppe, was einen Anteil von 4,9 % an der Gesamtpopulation der Phagozyten ausmachte ($p < 0,05$). Nach 72 Stunden kam es zu einer gesteigerten Apoptoserate in der 18R-HEPE-WT-Gruppe mit einem Maximum von 5,9 % (0,009 ± 0,001 x 10^6, n=4; $p < 0,05$). In den darauffolgenden 48 Stunden konnte mit 1,2 % ein vierfacher Rückgang auf 0,002 ± 0,0005 x 10^6 apoptotische M/M (n=4) beobachtet werden. Dieser Wert erwies sich als wesentlich geringer als der Endwert der WT-Gruppe ($p < 0,05$) (Abbildung 18 und 20).

Die unbehandelte ChemR23 -/- Gruppe lag zum Zeitpunkt 0 Stunden mit 643 ± 48 apoptotischen M/M (n=4) deutlich unter dem Ausgangswert der unbehandelten WT-Gruppe ($p < 0,05$). Das Maximum wurde bereits nach 24 Stunden mit 0,008 ± 0,0006 x 10^6 avitalen Zellen (n=2) erreicht ($p < 0,05$), was einen Anteil von 34 % der Gesamtpopulation ausmachte. Nach diesem Höhepunkt folgte ein kontinuierlicher Rückgang. Ein deutlicher Unterschied zu der WT-Linie konnte am Ende der Versuchsreihe nach 120 Stunden festgestellt werden. Es zeigten sich zu diesem Zeitpunkt 7-mal weniger apoptotische Phagozyten als in der WT-Vergleichsgruppe ($p < 0,05$) (Abbildung 18).

Im Gegensatz zu der unbehandelten ChemR23 -/- Reihe fand nach 72 Stunden bei der 18R-HEPE-behandelten KO-Gruppe eine erheblich gesteigerte Apoptose statt mit 34,6 % und 0,1 ± 0,01 x 10^6 Zellen (n=5). Allerdings lag die Anzahl der avitalen M/M in dieser

Gruppe um ein Vielfaches höher als in den anderen Versuchsgruppen ($p < 0,05$) (Abbildung 18 und 20).

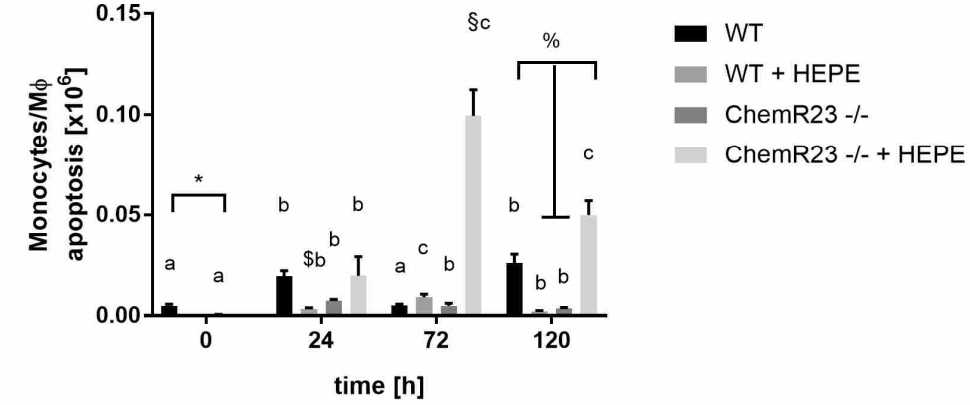

Abbildung 18: Apoptose der Makrophagen/Monozyten (M/M) in Mio/ml BAL

Auffällig ist die erhöhte Apoptose in der mit 18R-HEPE- (Abk: HEPE) behandelten ChemR23 -/- Gruppe im zeitlichen Verlauf. Auch die WT-Linie zeigte zum 24. und 120.-stündigen Messzeitpunkt gesteigerte Apoptosewerte im Vergleich zu den anderen Gruppen. Dargestellt ist die durch FACS ermittelte Anzahl der apoptotischen M/M pro Milliliter BAL (gewonnen aus 18R-HEPE-behandelten und nicht-behandelten WT- und ChemR23 -/- Mäusen). Die Entnahme erfolgte 0, 24, 72 und 120 Stunden nach LPS-Behandlung. Gezeigt werden die Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM), n = 2-5. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten. Nur p-Werte < 0,05 wurden gekennzeichnet.

3.3.2.2 Nekrose bei den Monozyten/Makrophagen in der BAL

Im Vergleich zur Apoptose befanden sich in der Lavage weitaus weniger nekrotische M/M. Das absolute Maximum an nekrotischen Zellen wurde in der Gruppe des WT zum 120-stündigen Messzeitpunkt mit 0,01 ± 0,003 x 10^6 (n=4) festgestellt. Dieser Endwert zeigte sich gegenüber den anderen Vergleichsgruppen als signifikant ($p < 0,05$). Der größte Anteil an nekrotischen M/M innerhalb der Gesamtpopulation konnte nach 72 Stunden mit 6,9 % festgestellt werden (Abbildung 19 und 20).

Die unbehandelte WT- und ChemR23 -/- Gruppe wies bereits zu Beginn der Versuchsreihe relevante Unterschiede zueinander auf ($p < 0,05$). So waren ohne LPS-Stimulation bei den WT- Mäusen 519 ± 8 Zellen nekrotisch (n=3) und bei dem KO-Tieren nur 70 ± 15 MM (n=3). Im Vergleich zur WT-Reihe zeigten die ChemR23 -/- Mäuse im Zeitverlauf einen geringeren Nekroseprozeß. Der größte Nekroseanteil konnte bei den KO-Tieren nach 24 Stunden mit 4,8 % und 0,001 ± 0,0005 x 10^6 M/M (n=2) beobachtet werden (Abbildung 19 und 20).

In der behandelten WT- und ChemR23 -/- Gruppe wurde die höchste Nekroserate nach 72 Stunden mit jeweils 6,2 % und 2,1 % erreicht. Die Anzahl an nekrotischen M/M lag bei dem mit 18R-HEPE-behandelten WT zu diesem Zeitpunkt mit 0,01 ± 0,002 x 10^6 Zellen deutlich höher als bei den unbehandelten WT- ($p < 0,05$) und ChemR23 -/- Gruppen ($p < 0,05$). Nach diesem Höhepunkt zeigten sich in beiden behandelten Gruppen rückläufige Ergebnisse. Allerdings konnte mit einem siebenfach schnelleren Abfall ($p < 0,05$) ein deutlicher Rückgang in der 18R-HEPE-ChemR23-KO-Gruppe beobachtet werden (Abbildung 19).

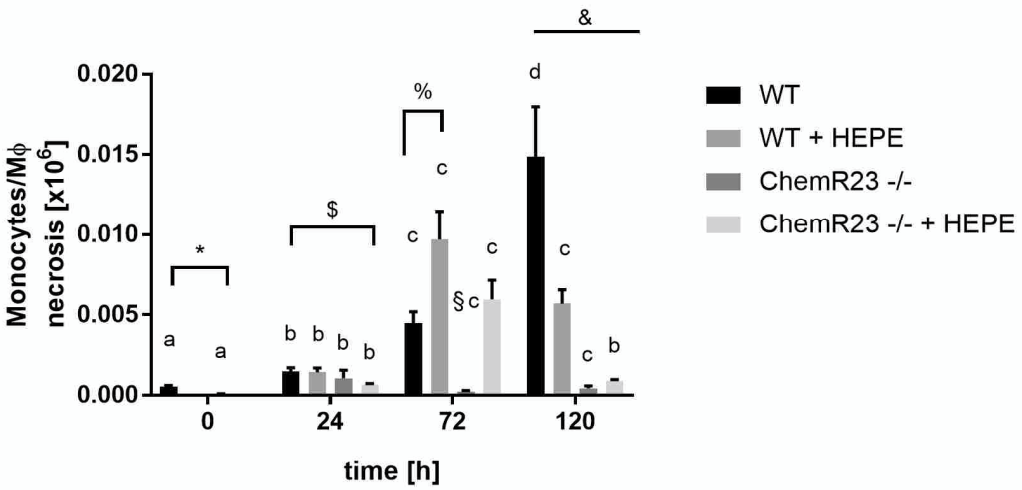

Abbildung 19: Nekrose der Makrophagen/Monozyten (M/M) in Mio/ml BAL

Die Anzahl an nekrotischen M/M steigt nach 72 Stunden in der WT, WT + 18R-HEPE und ChemR23 -/- + 18R-HEPE Gruppe sprunghaft an, wobei die 18R-HEPE (Abk: HEPE) unbehandelte ChemR23 -/- -Linie sogar sinkt. Die geringsten Nekroseraten liegen nach weiteren 48 Stunden in beiden ChemR23 -/- Gruppen. Dargestellt ist die durch FACS ermittelte Anzahl der nekrotischen M/M pro Milliliter BAL (gewonnen aus 18R-HEPE-behandelten und nicht-behandelten WT- und ChemR23 -/- Mäusen). Die Entnahme erfolgte 0, 24, 72 und 120 Stunden nach LPS-Behandlung. Gezeigt werden die Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM), n = 2-5. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Die Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten. Nur p-Werte < 0,05 wurden gekennzeichnet.

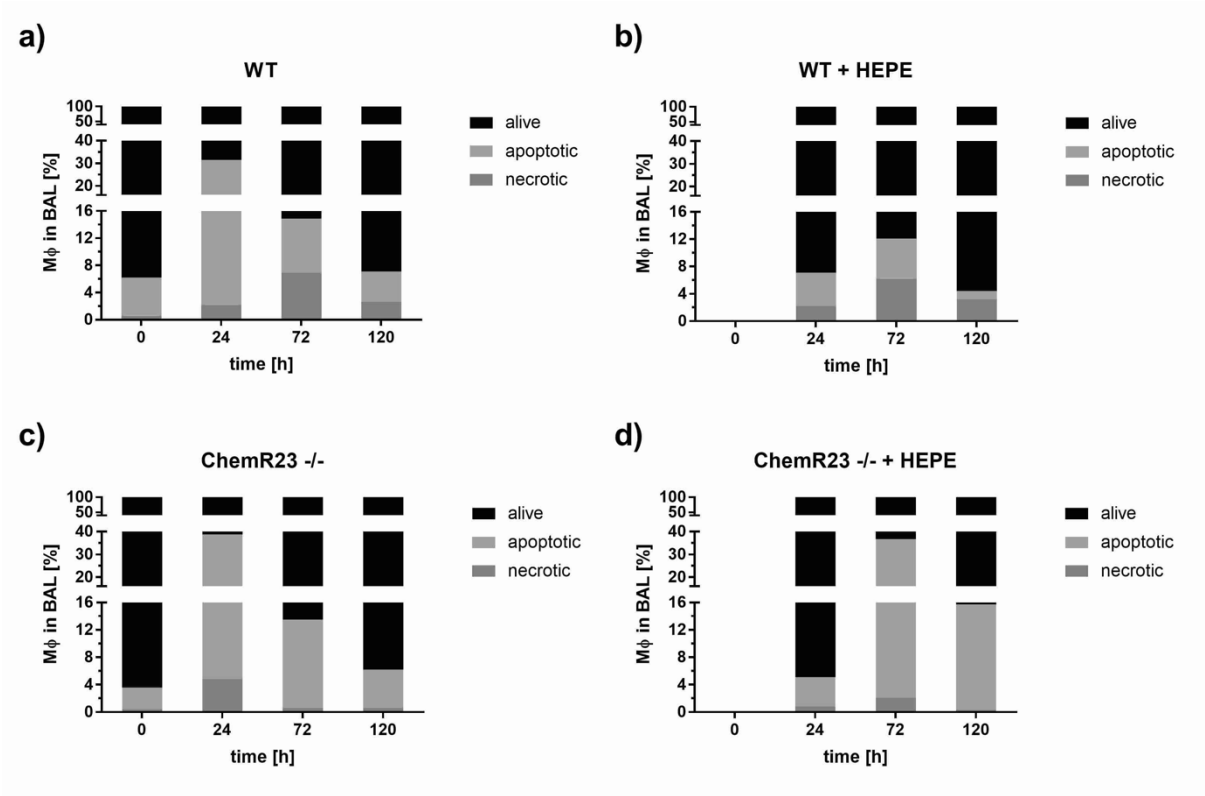

Abbildung 20: Verteilungsmuster apoptotischer, nekrotischer und vitaler M/M in der BAL im Zeitverlauf nach LPS- und 18R-HEPE-Behandlung in Fraktionen in 100%

Dargestellt ist die durch FACS ermittelte prozentuale Verteilung der apoptotischen und nekrotischen M/M in den Vergleichsgruppen WT (**a**), WT + 18R-HEPE (Abk: HEPE) (**b**), ChemR23 -/- (**c**) und ChemR23 -/- + 18R-HEPE (**d**) pro Milliliter BAL, n = 2-5. Die Entnahme erfolgte 0, 24, 72 und 120 Stunden nach LPS-Behandlung.

4 Diskussion

Das membranständige Zelloberflächenprotein ChemR23 (CMKLR-1) ist ein wichtiger Rezeptor, der für die Aktivierung und Regulierung intrazellulärer inflammatorischer Signaltransduktionkaskaden verantwortlich ist. Der Rezeptor wird vermehrt auf der Zelloberfläche von Leukozyten wie Makrophagen, Mikroglia, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert und moduliert chemotaktische Prozesse, welche die Zellen, nach Stimulierung durch Chemerin, zu Entzündungsherden dirigieren. ChemR23 ist auch auf der Oberfläche nicht-leukozytärer Zellen wie Endothelzellen, Adipozyten, Hepatozyten und Myozyten anzufinden, wo er verschiedene Funktionen wie Gefäßdurchlässigkeit und metabolische Prozesse reguliert (51). Auf B- und T-Lymphozyten, Granulozyten und Thrombozyten konnte der ChemR23 Rezeptor bis jetzt nicht oder nur in geringen Mengen nachgewiesen werden (45,46,49).
In dieser Arbeit sollte ermittelt werden, wie sich antiinflammatorische 18R-HEPE-Derivate auf die Resolution der LPS-vermittelten Entzündung der Lunge über den ChemR23 Rezeptor auswirken.

4.1 Pulmonale Applikation von LPS als Tiermodell für Studien zu infektiösen Lungenerkrankungen

Die für die vorliegende Arbeit verwendete LPS-Stimulationskonzentration wurde in Anlehnung auf frühere Ergebnisse aus unseren bzw. anderen Arbeitsgruppen ausgewählt (Dissertation Reichert, M., 2015) (92,93). In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Modelle etabliert, um pulmonale Traumata in Mäusen zu simulieren, um klinische und in vitro Studien rund um das akute Lungenversagen (ALI) und ARDS zu unterstützen (94,95). Da die Pathogenese von ALI und ARDS multifaktoriell ist, sie können zum Beispiel durch Sepsis, Traumata oder Aspiration ausgelöst werden (96,97), versucht man, diese Risikofaktoren mittels verschiedener, steuerbarer Interventionen wie Hyperoxie, Säureapplikation, Exposition an lebenden Bakterien oder Gabe von Ölsäure, im Labor nachzustellen (95).
Ein beliebtes, reproduzierbares und leicht zu etablierendes Modell für ARDS ist die Behandlung von Tiermodellen mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS), die entweder intravenös, intranasal oder intratracheal erfolgen kann (94,95,98–100). Tiermodelle von LPS-induzierten Entzündungsprozessen sind daher ein nützliches Instrument, um

Wirtsreaktionen, zum Beispiel die leukozytäre Migration in entzündetes Gewebe, zu analysieren, die bei infektiösen Krankheitsprozessen innerhalb der Lunge aktiviert werden.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass es im Lungengewebe und in der BAL bis 72 Stunden nach LPS-Behandlung zu einem Anstieg der Anzahl aller Leukozyten kam, der nach 120 Stunden, mit Ausnahme der Makrophagen, auf den vor LPS-Behandlung gemessenen Wert zurückging. In Menschen produzierte die intratracheale Instillation mit LPS ein kontrolliertes akutes Lungenversagen, das sich in eine frühe, bis 24 Stunden p.a. und eine späte, bis 24-48 Stunden p.a., andauernden Phase gliedern ließ (101). Die frühe Phase war charakterisiert durch Lungenödem, Ausschüttung von Albumin und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α, IL-8 oder MCP-1 sowie die Migration von Granulozyten aus dem Gefäßsystem in den alveolaren Raum (BAL) (101–103). In der späten Phase normalisierte sich die Menge an ausgeschütteten proinflammatorischen Zytokinen in der BAL, die Rekrutierung der Granulozyten blieb jedoch bestehen (101–103). Ähnliche Phasen wurden auch bei LPS-behandelten Mäusen beschrieben: Entzündungsmarker wie TNF-α oder MIP2 konnten in der BAL schon sehr früh nach Applikation von LPS nachgewiesen werden, ohne dass eine nennenswerte Migration von Leukozyten erfolgte, die erst 24 Stunden nach LPS-Behandlung nachgewiesen werden konnte (92,93,104–106).

Daher sind die akuten Symptome der LPS-Behandlung, je nach Leukozytentyp, auf einem zeitlichen Abschnitt von maximal 48 bis 72 Stunden begrenzt. Nach 72 Stunden erfolgt ein Abfall der Anzahl der Granulozyten in der BAL und damit eine Selbstlimitierung der Entzündungsreaktion (Resolution) (92–94,107). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen berichtete eine andere Arbeitsgruppe, dass die Anwendung von vernebelten LPS bei Mäusen zu einer gesteigerten Leukozytenkonzentration bis 5 Wochen nach Exposition führte (108).

4.2 Die Leukozytenverteilung in der Lunge von LPS-unbehandelten Wildtyp- und ChemR23-KO-Mäusen unterscheidet sich

Zur korrekten Interpretation unserer Ergebnisse soll zunächst darüber diskutiert werden, ob sich in unserem Versuchsaufbau die Verteilung der Leukozyten in Lunge und BAL in Wildtyp-Mäusen so verhielt wie zuvor in anderen Studien beschrieben. Unsere

Ergebnisse zeigten, dass im Gewebe der LPS-unbehandelten Lunge von Wildtyp-Mäusen die leukozytäre Population aus 20 % PMN, 55 % Lymphozyten und 25 % Makrophagen bestand während in der BAL, erwartungsgemäß, fast ausschließlich Makrophagen zu finden waren. Das von uns durchflusszytometrisch ermittelte Verteilungsmuster der leukozytären Subpopulationen im LPS-unbehandelten, und demnach nicht entzündeten Lungengewebe, ähnelt dem vorheriger Publikationen (104). Im Jahr 1999 ermittelten Heitmann *et al*., dass im gesunden Lungengewebe hauptsächlich Lymphozyten (T-Lymphozyten) anzutreffen waren, während in der BAL 90 % der leukozytären Population aus Makrophagen bestand und nur 10 % aus Lymphozyten. PMN konnten nicht nachgewiesen werden (104).

Die ChemR23-KO-Maus (Cmklr1^{tm1Drg}, ChemR23 -/-) wurde etabliert, um den Einfluss des Rezeptors auf die entzündungsvermittelte Chemotaxis von Leukozyten zu untersuchen (109). Im Zymosan-induzierten peritonealen Entzündungsmodell das in der Originalpublikation beschrieben wurde, konnte nachgewiesen werden, dass in ChemR23-KO-Mäusen die Chemotaxis von Makrophagen und von neutrophilen Granulozyten drastisch herabgesetzt war (109). In unserem Versuchsaufbau konnten wir bei dem Vergleich der Leukozytenverteilung in der Lunge von ChemR23-KO- und Wildtyp-Mäusen einige Unterschiede feststellen. In der ChemR23-KO-Maus war die Anzahl der Makrophagen ähnlich derjenigen der Wildtyp-Tiere. Die Menge der PMN war jedoch erhöht (40%) und die der Lymphozyten erniedrigt (35%). In der BAL fanden wir stattdessen, genauso wie in den Wildtyp-Mäusen, ausschließlich Makrophagen. Ihre Gesamtzahl war in den KO-Mäusen jedoch signifikant geringer. Dies könnte auf das Fehlen des ChemR23 Rezeptors und daher auf eine verringerte Chemotaxis der Makrophagen zurückzuführen sein. Unseres Wissens gibt es bislang keine weiteren FACS-basierten Studien, die das Verteilungsmuster von PMN, Makrophagen und Lymphozyten in ChemR23-KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beschreibt.

4.3 Die Abwesenheit des ChemR23 Rezeptors beeinflusst die Rekrutierung von Makrophagen, Lymphozyten und PMN nach LPS-Behandlung

Verschiedene Studien zeigten, dass die Infektion mit Bakterien oder die Gabe von LPS zu einer Transmigration von Leukozyten vom Gefäßsystem durch das Endothel in das Lungengewebe und den Alveolarraum führt (92,93,105,106). Die Instillation mit

Haemophilus influenzae Typ b, einem gramnegativen Bakterium, hatte zum Beispiel im Lungengewebe und in der BAL zur Folge, dass die Anzahl der neutrophilen Granulozyten anstieg, während die der Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen nahezu konstant blieb (104). In Kombination mit der LPS-Behandlung sind ChemR23-KO-Mäuse also ein ausgezeichnetes experimentelles Modell für die Analyse der Transmigration von Leukozyten bei akuten pulmonalen Entzündungsprozessen.

In unserer Untersuchung fanden wir heraus, dass bis 72 Stunden nach LPS-Behandlung in BAL und Lungengewebe der ChemR23-KO- und der Wildtyp-Maus die Anzahl der Makrophagen relativ konstant blieb. 120 Stunden nach LPS-Behandlung stieg die Anzahl der Makrophagen im Wildtyp sehr stark an, jedoch nicht im ChemR23-KO. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass die Abwesenheit des ChemR23 Rezeptors einen Einfluss auf die Rekrutierung von Lymphozyten und PMN ausübte. Insgesamt betrachtet war die Anzahl der in der ChemR23-KO-Maus maximal rekrutierten PMN und Lymphozyten in der BAL erheblich höher als im Wildtyp. Außerdem erfolgte in der Lunge die Transmigration der PMN und Lymphozyten im ChemR23-KO 24 Stunden früher und war höher als im Wildtyp. Diese Ergebnisse untermauern vorherige Messungen unserer Arbeitsgruppe, die zeigten, dass bei einer LPS-vermittelten Entzündung generell die Rekrutierung von Leukozyten in der ChemR23-KO signifikant erhöht ist (110).

Andere Studien zeigten, dass bei LPS-behandelten ChemR23-KO-Mäusen sowohl die Anzahl der rekrutierten neutrophilen Granulozyten als auch die der Makrophagen in BAL und Lungengewebe deutlich höher als bei Wildtyp-Mäusen war (53). Auch führte eine Infektion mit dem Mäuse Pneumonie Virus (PMV) zu einer signifikant höheren Transmigration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe von ChemR23-KO-Mäusen (52). Dies führten die Autoren auf eine erhöhte Ausschüttung von Chemerin/ChemR23 unabhängigen Chemokinen zurück, die die Entzündungsreaktion im ChemR23-KO förderten (52). Stattdessen veränderte sich die Anzahl der Makrophagen und der neutrophilen Granulozyten in der BAL der ChemR23-KO-Mäuse nicht, wenn sie mit Zigarettenrauch behandelt wurden, während es im Wildtyp zu einem deutlichen Anstieg kam (111). In einem Zymosan-induzierten Peritonitis Modell wurden zwischen ChemR23-KO- und Wildtyp-Mäusen andererseits keine Unterschiede in der Anzahl der in die Peritoneallavage transmigrierten Makrophagen gefunden (109).

Eine Verringerung der rekrutierten Makrophagen bei fehlendem ChemR23 Rezeptor ist zu erwarten: ChemR23 wird auf Makrophagen stark exprimiert und ist für deren

Transmigration von wesentlicher Bedeutung. Durch die Bindung des chemischen Lockstoffes Chemerin an den ChemR23 Rezeptor wird die Bindung der Makrophagen an Fibronectin und VCAM-1 gefördert (112) und somit deren Migration durch das Endothel stimuliert (49,113). Das Fehlen dieses Rezeptors sollte daher zu einer Behinderung der Migration der Makrophagen zum Entzündungsgeschehen führen und infolgedessen zu einer Verminderung ihrer Anzahl in der BAL. In Anlehnung hierzu, maß man im Modell die durch Zigarettenrauch induzierte Entzündungsreaktion eine Erhöhung der Chemerin Sekretion im Atemwegsepithel, die zu einer gesteigerten Rekrutierung von Makrophagen in der Lunge der Wildtyp- jedoch nicht in der der ChemR23-KO-Mäusen führte (111).
Im Gegensatz zu den Makrophagen, bewirkte das Fehlen des ChemR23 Rezeptors eine Steigerung der Transmigration von Lymphozyten und PMN. Da diese Zellen ChemR23 gar nicht oder nur in geringen Mengen exprimieren (33,49), könnte es sich bei der Zunahme der Rekrutierung der PMN und der Lymphozyten um einen durch andere Zelloberflächenrezeptoren vermittelten sekundären Effekt handeln, den wir anhand unseres Versuchsmodells noch nicht vollständig klären konnten. Die Transmigration von PMN und Lymphozyten wird durch verschiedene Chemokin Rezeptoren vermittelt, die unter anderem auf Liganden reagieren können, die von Makrophagen ausgeschüttet werden. Dazu gehören, zum Beispiel, CXCR1 und 2, welche die Rekrutierung zu Entzündungsherden fördern und CCR2, welches die Transmigration durch das Endothel aktiviert (114,115). Bei einer Entzündungsreaktion schütten Makrophagen CXCR1/2 und CCR2 Liganden aus, die die Chemotaxis und die Transmigration bei PMN induzieren (114,116–118). Da wir, sowohl in der BAL als auch in der Lunge, nach LPS-Behandlung vermehrt PMN fanden, scheint dieser Mechanismus in den ChemR23-KO intakt zu sein. Die vermehrte Transmigration von Leukozyten in die Lungen von ChemR23-KO-Mäusen könnte auf eine erhöhte Ausschüttung, beispielsweise durch das Atemwegsepithel, von proinflammatorischer Chemokinen zurückzuführen sein, die unabhängig von der Chemerin/ChemR23 Axis wirken und kompensatorisch hochreguliert wird. Gleichermaßen wäre denkbar, dass der ChemR23-KO eine kompensatorische Überexpression von Chemokin Rezeptoren auf der Zelloberfläche von PMN und Lymphozyten verursacht, welche dann zu einer gesteigerten inflammatorischen Reaktion führen könnte. Beide Szenarien wären möglich, müssen jedoch durch zusätzliche Studien bewiesen werden.
Die immer wieder in der Literatur beschriebenen Divergenzen zwischen pro- und antiinflamatorischer Wirkung der ChemR23/Chemerin Axis beruhen sehr wahrscheinlich

auf Unterschiede im untersuchten Entzündungsmodell beziehungsweise der Messungs- und Auswertungskriterien und den betrachteten Organsystem (119). Unsere Ergebnisse unterscheiden sich teilweise von denen anderer Studien, die anhand LPS-behandelten Lungen gemacht wurden. Zum Beispiel konnten wir im Gegensatz zu Luangsay *et al.* keine Erhöhung der Makrophagenanzahl in Lungengewebe und BAL nach LPS-Behandlung der ChemR23-KO-Maus messen (53). Dies könnte daran liegen, dass in den vorliegenden Studien an LPS-behandelten ChemR23-KO-Lungen unterschiedliche Mäuse-Stämme verwendet wurden: Während Luangsay *et al.*, aber auch Bondue *et al.* im PMV Modell, Cmklr1^{tm1Dgen} KO-Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp-Mäusen verwendeten (52,53), benutzten Hecker *et al.* Cmklr1^{tm1Drg} KO-Mäuse im Vergleich zum Sv129/S1 Wildtyp (110) während in dieser Studie Cmklr1^{tm1Drg} KO-Mäuse im Vergleich zum C57BL/6 Wildtyp benutzt wurden. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Mäuse Stämme unterschiedlich auf LPS reagieren (95,120,121). Zum Beispiel sind BALB/c Mäuse gegenüber LPS sensitiver als C57BL/6 (95). Weitere Faktoren, die die Ergebnisse beeinflussen könnten, sind Geschlecht, Größe und Alter der Mäuse oder Applikationsart des LPS (95). Es ist daher wichtig bei dieser Art von Studien vergleichbare Bedingungen zu etablieren, da es aufgrund unterschiedlicher experimenteller Ansätze sonst zu Fehlinterpretationen und falschen Generalisierungen von Aussagen kommen könnte.

Auch ist es wichtig den besten Zeitraum für die Messungen der einzelnen leukozytären Subpopulationen genau zu bestimmen. Unsere Ergebnisse zeigen nämlich erhebliche Verschiebungen in den Zeitpunkten, an denen man die maximale Transmigration der verschiedenen Leukozyten messen konnte. So erfolgte beispielsweise die Transmigration der PMN in die Lunge der ChemR23-KO-Maus 24 Stunden früher als bei der Wildtyp-Maus. Interessant ist auch die Beobachtung, wonach im Wildtyp die Anzahl der Makrophagen erst 120 Stunden nach LPS-Behandlung ihr Maximum erreicht, also 24 Stunden später als bei den PMN. Außerdem gab es in beiden Tierstämmen eine 24-stündige Verzögerung des Zeitpunktes des maximalen Anstiegs der Zellzahl in der BAL. Eine zeitliche Verschiebung der Transmigration von Leukozyten in die BAL im Vergleich zur Lunge wurde bereits früher beschrieben. Sie bestätigt, dass die Zellen, nachdem sie durch das Endothel migriert, sind im Lungengewebe verweilen, bevor sie in den alveolaren Raum übertreten (Dissertation Reichert, M., 2015) (104,122–124).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit könnten wir also bestätigen, dass die Gabe von LPS sowohl in der Wildtyp- als auch in der ChemR23-KO-Maus zu einer Transmigration von

Leukozyten aus dem Gefäßsystem in das Lungengewebe führt. Dabei hat die Abwesenheit von ChemR23 nicht nur einen Einfluss auf die Rekrutierung der Makrophagen, sondern auch auf die der Lymphozyten und PMN. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Mäuse-Stämmen war, dass im Vergleich zum Wildtyp sowohl der Grundhaushalt als auch die Transmigration der Makrophagen in der ChemR23-KO-Maus signifikant reduziert waren, während sie in den PMN und Lymphozyten gestiegen waren, obwohl letztere den ChemR23 Rezeptor nicht oder nur in geringen Mengen exprimieren. Es konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit allerdings nicht geklärt werden, weshalb der Verlust von ChemR23 zu einer Erhöhung der Transmigration dieser Leukozyten führt. Insgesamt lassen unsere Ergebnisse darauf schließen, dass bei LPS-induzierter Entzündungsreaktion der ChemR23 Rezeptor antiinflammatorisch wirkt.

4.4 Die Resolvin E1-Vorstufe 18R-HEPE wirkt sich auf die Entzündungsresolution in der Lunge von Wildtyp- und ChemR23-KO-Mäusen unterschiedlich aus

Neutrophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, sie können jedoch bei fälschlicher Aktivierung oder längerem Anhalten der Entzündung zu Gewebsschädigungen und zur Förderung der Pathogenese führen (125,126). Verantwortlich für den kontrollierten Rückgang der Enzündungsreaktion nach der akuten Phase (Resolution) sind unter anderen Ω-3 polyunsaturierten Fettsäurederivate, Resolvine genannt (RvE1, 2 und 3) (33,127,128). Alle Resolvine entstehen während der akuten Entzündungsphase durch Metabolisierung aus EPA mit 18R-HEPE als intermediäres Stoffwechselprodukt (129,130). RvE1 bindet agonistisch am ChemR23 Rezeptor, mindert die TNF-α-vermittelte Aktivierung von NF-kB, verringert die Migration von Granulozyten, aktiviert Phagozytose, und stimuliert die Regeneration des Gewebes (88,127,128). RvE1 wirkt sich außerdem antagonistisch auf dem Leukotrien B4 Rezeptor 1 (BLT1) Rezeptor aus (88,131). BLT1 wird auf verschiedenen Leukozyten exprimiert und fördert deren Interaktion mit dem Endothel und deren Rekrutierung (132). Bei einem BLT1-KO-Maus-Modell konnten weniger Entzündungsfaktoren und eine geringere Leukozytentransmigration gemessen werden (Dissertation Reichert, M., 2015) (33). RvE2 blockiert die Migration von PMN und besitzt auch eine antiinflammatorische

Wirkung (133). RvE3 ist noch wenig untersucht, soll aber auch antiinflammatorische Wirkung besitzen (134).

Unsere Ergebnisse zeigten, dass in Wildtyp-Tieren die wiederholte Gabe der RvE1 Vorstufe 18R-HEPE nach LPS-Behandlung zu einem im Vergleich zu unbehandelten Tieren stärkeren Anstieg der Anzahl von Leukozyten in der Lunge und der BAL führte. Die Anzahl der Makrophagen stieg durch die Gabe von 18R-HEPE nur geringfügig an und blieb konstant unter derjenigen der unbehandelten Mäuse. In der Lunge der behandelten ChemR23-KO-Mäuse war erst 72 Stunden nach LPS-Behandlung nur die Anzahl der PMN gegenüber den unbehandelten Tieren erhöht. In der BAL der ChemR23-KO-Mäuse fiel die Verteilung im Vergleich zur Lunge anders aus. Hier gab es nach 18R-HEPE-Behandlung eine Reduktion der Infiltration der PMN und der Lymphozyten, jedoch eine Erhöhung der Anzahl der Makrophagen.

Anhand der in dieser Studie durchgeführten Messungen ist es schwierig, eine generelle Aussage darüber zu treffen, wie sich die Gabe von 18R-HEPE auf die LPS-induzierte Entzündungsreaktion in der Lunge auswirkt. Insgesamt zeichnet sich ab, dass sich die antiinflammatorische Wirkung von 18R-HEPE unterschiedlich auf die verschiedenen Unterklassen von Leukozyten auswirkt. Es wird auch nochmal deutlich, dass der Zeitpunkt, an dem die Messungen durchgeführt werden, ein wichtiger Faktor ist, auf dem man bei der Interpretation der Daten achten muss, da man das Abklingen der LPS-Reaktion, die Unterschiede im Aktivierungszeitpunkt der verschiedenen Leukozyten und die 24-stündige Verschiebung der Transmigration der Zellen in die BAL berücksichtigen muss. Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse jedoch darauf hin, dass die Applikation von 18R-HEPE, außer bei Makrophagen, teilweise eine Aktivierung der Transmigration der Leukozyten bewirkt. Bei Makrophagen scheint die Gabe von 18R-HEPE zumindest bei den Wildtyp-Mäusen tatsächlich zu der erwarteten Reduktion der Transmigration zu führen.

Bislang haben sich nur wenige Studien damit befasst, die Wirkung der 18R-HEPE-Behandlung bei LPS-induziertem akuten Lungenversagen zu analysieren. Viele Studien untersuchten das Resolvin-System anhand anderer Organsysteme oder Zelllinien und nach direkter Gabe von Resolvin. Frühere Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen zeigten jedoch deutlich, dass Resolvine, aber auch 18R-HEPE, antiinflammatorisch wirken (57,110,131,135). Die intravenöse Gabe von RvE1 reduzierte die Infiltration von PMN und dendritischen Zellen in Schleimhäute nach Zymosan-induzierter Peritonitis (85,88,136,137). In der Schleimhaut des

gastrointestinalen Traktes konnte RvE1 die Resolution der Infiltration neutrophiler Granulozyten vermitteln (136) und supprimierte deren Akkumulation in der Lunge bei ALI (*Acid induced lung injury*) (138). Des Weiteren reduzierte RvE1 die Expression neutrophiler Adhäsionsmoleküle (139) und aktivierte die Phagozytose apoptotischer Granulozyten durch Makrophagen (137). RvE1 wirkte sich auf antigenpräsentierende Zellen aus und reduzierte die ChemR23-vermittelte Ausschüttung von IL-12 (33). Auch bei Allergie-bedingter Entzündung der Atemwege führte die Behandlung mit RvE1 zu einer verringerten Transmigration von Leukozyten in das Lungengewebe (140). Demnach besitzt RvE1 eine klare antiinflammatorische Wirkung, welche sich unter anderem durch eine reduzierte Transmigration der Leukozyten äußert (129,130). RvE2 wird eine ähnliche Wirkung zugeschrieben (133). In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe führte die subkutane Applikation von 18R-HEPE zu einer erhöhten Infiltration von Makrophagen und einer erniedrigten Infiltration von PMN und verringerte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Dissertation Reichert, M., 2015) (135). Jedoch muss man anhand der vorliegenden Daten annehmen, dass die Gabe von RvE1 und 18R-HEPE eventuell nicht die gleichen Effekte haben. Zum Beispiel könnte die Art und Weise der Applikation der Substanzen, oral, intravenös, subkutan oder intraperitoneal zu Unterschieden in Resorption, Metabolisierung und Wirkung führen.

Aus welchem Grund in unserem Modellsystem die Gabe von 18R-HEPE die Transmigration von Leukozyten in den Wildtyp förderte, ist im Moment unklar. Eine Erhöhung der leukozytären Transmigration wäre beim ChemR23-KO zu erwarten gewesen, da RvE1 bei der Aktivierung des Rezeptors eine antiinflammatorische Wirkung ausübt. Man könnte spekulieren, dass die widersprüchlichen Ergebnisse auf die Verstoffwechselung von 18R-HEPE zu verschiedenen Resolvinen (RvE1, RvE2, RvE3) zurückführen sind. Obwohl angenommen wird, dass RvE2 und RvE3 ähnliche Wirkung wie RvE1 haben, gibt es Studien, die belegen, dass die RvE3 zellspezifische Reaktionen auslösen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entzündung aktiv sind (128). Außerdem scheint es Abweichungen bei ihrer molekularen Wirkungsweise zu geben (141). Über die Funktion von RvE3 ist im Übrigen nur wenig bekannt.

Zusammenfassend, anhand der hier vorliegenden Ergebnisse und im Vergleich zu früheren Studien, können wir schlussfolgern, dass die Effekte von 18R-HEPE je nach Zelltyp, Entzündungstimulus, Untersuchungszeitpunkt und wahrscheinlich applikationsweise unterschiedlich ausfallen können.

4.5 Apoptose und Nekrose von PMN und Makrophagen werden durch 18R-HEPE verstärkt

Zwar ist das Eindringen von Makrophagen und PMN in entzündetes Gewebe notwendig für die Bekämpfung akuter Infektionen, jedoch ist die Beseitigung der transmigrierten Zellen und ihres histotoxischen Inhaltes durch die sogenannte Resolution unerlässlich, für den vollständigen Heilungsprozess und um eine unkontrollierte Ausbreitung der Entzündung zu verhindern. Apoptose und Nekrose fördern den Prozess Resolution von Entzündungsreaktionen (142,143). Gesteuert von internen und externen Faktoren gehen PMN-Apoptose ein, die, im Gegensatz zur Nekrose, das geregelte „Herunterfahren" sekretorischer Prozesse ermöglicht und die Ausschüttung von histotoxischen Molekülen aus sterbenden Zellen verhindert. Apoptotische PMN werden schließlich von Makrophagen phagozytiert, was zu einer herabgesetzten Entzündungsreaktion führt (142,143). Im Gegensatz dazu haben nekrotische Zellen oft eine proinflammatorische Wirkung (144).

In dieser Arbeit wollten wir analysieren, ob der Knockout des ChemR23 Rezeptors eine Auswirkung auf apoptotische bzw. nekrotische Prozesse in Makrophagen und PMN besitzt. Unsere Ergebnisse zeigten, dass im zeitlichen Verlauf nach LPS-Exposition die Anzahl apoptotischer PMN in den ChemR23-KO-Mäusen höher war als bei den Wildtyp-Mäusen. Diese Beobachtung könnte auf eine reduzierte Phagozytose von Seiten der Makrophagen zurückzuführen sein. Tatsächlich wurde in einem Zymosan-induzierten Peritonitis Modell gezeigt, dass in der ChemR23-KO-Maus die Anzahl der durch Makrophagen aufgenommenen apoptotischen Zellen signifikant reduziert war (145). Im Gegensatz zu den PMN war die Anzahl apoptotischer Makrophagen in der Abwesenheit des ChemR23 Rezeptors geringer, was entweder durch eine reduzierte phagozytotische Aktivität oder durch ihre ohnehin kleinere Anzahl in der Lunge der ChemR23-KO-Maus bedingt sein könnte.

In beiden Mäuse-Stämmen führte die Behandlung mit 18R-HEPE zu einer 24-stündigen Verzögerung des Anstiegs der Anzahl apoptotischer PMN, wobei dieser in der Abwesenheit des ChemR23 Rezeptors viel stärker ausgeprägt war. RvE1 fördert die Caspase-abhängige Apoptose von neutrophilen Granulozyten und die Resolution der Entzündung und blockiert zugleich zelluläre Überlebensmechanismen in verschiedenen Modellen von ARDS (146,147). Blockiert jedoch das Fehlen des ChemR23 Rezeptors auf den Makrophagen die Phagozytose, können die Granulozyten nicht abgebaut werden

und würden im Lungengewebe der KO-Maus akkumulieren. RvE1 entfaltet seine Wirkung über verschiedene Rezeptoren, unter anderem ChemR23 und BLT1. Über BLT1 wird die Apoptose der neutrophilen Granulozyten gefördert, während über ChemR23 die Phagozytose der apoptotischen Zellen vermittelt wird (33,109,146,147). Die gesteigerte Anzahl apoptotischer PMN nach Gabe von 18R-HEPE könnte eventuell auch durch dessen Wirkung auf den BLT1 Rezeptor vermittelt werden. Aus welchem Grund jedoch die Menge der apoptotischen Makrophagen in der ChemR23-KO-Maus so stark erhöht ist, ist momentan unklar.

Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen war die Anzahl nekrotischer PMN und Makrophagen in den ChemR23-KO-Mäusen niedriger. Haben Makrophagen ausreichend viele apoptotische Zellen aufgenommen, so sinkt ihr Vermögen weitere Zellen zu phagozytieren (148). Apoptotische PMN, die nicht phagozytiert werden, durchlaufen einen Prozess der sekundären Nekrose. Sekundäre Nekrosen von neutrophilen Granulozyten führen zur unkontrollierten Ausschüttung von histotoxischen Substanzen und infolgedessen zu extensiven Gewebsschädigung und fortlaufender Entzündung (148,149). In Wildtyp-Mäusen könnte dieser Prozess wegen der intakten phagozytotischen Aktivität der Makrophagen exazerbiert sein, wodurch mehr Granulozyten in die Nekrose übergehen. Im Knockout hingegen fällt die nekrotische Reaktion durch den fehlenden ChemR23 Rezeptor insgesamt milder aus.

Auch gehen in den Wildtyp-Mäusen mehr Makrophagen durch Nekrose unter als in den KO-Mäusen. Dies könnte ebenfalls eine Auswirkung einer übermäßig starken LPS-induzierten Entzündungsreaktion sein, die sich nur dann manifestiert, wenn der ChemR23 Rezeptor vorhanden ist. Interessanterweise wird dieser Effekt durch die Behandlung mit 18R-HEPE im Wildtyp noch weiter verstärkt, was darauf hindeutet, dass der Rezeptor tatsächlich in der Steuerung nekrotischer Prozesse in Leukozyten involviert ist.

4.6 Therapeutischer Ausblick

Erkrankungen, die zu einer unkontrollierten pulmonalen Entzündung führen können, stellen eine besondere medizinische Herausforderung dar, da ihre Pathogenese meist multifaktoriell ist (96,97). Entzündliche Prozesse entstehen im Lungengewebe, beispielsweise bei Asthma oder zystische Fibrose, und werden durch virale oder bakterielle Infektionen, Aspiration, Allergien und schädigenden Umwelteinflüssen gefördert (97). Etliche Studien beschäftigen sich mittlerweile mit der Aufklärung der

molekularen und immunologischen Steuerungsmechanismen, die der Pathogenese von pulmonalen Entzündungsreaktionen zugrunde liegen. Dabei kristallisiert sich immer mehr heraus, dass die zellulären Mechanismen, die diese fördern und abklingen lassen, genauso variabel sind wie die ihnen zugrundeliegenden pathogenetischen Ursachen (97). Nach dem aktuellen Stand der Forschung geht man davon aus, dass Lipidmediatoren, die aus Ω-3-Fettsäuren (Docosahexaensäure oder EPA) entstehen, eine antiinflammatorische Wirkung besitzen, die man sich therapeutisch zu nutzen machen kann. Zu diesen Lipidmediatoren gehören unter anderem die Resolvine.

Die Gabe von Vorstufen der Resolvine wie EPA führte bei einem Modell der Pneumonie zu einem reduzierten bakteriellen Wachstum (138). Die enterale Gabe von EPA konnte außerdem die Morbidität und Mortalität von ALI/ARDS durch verringerte PMN-Transmigration herabsetzen (150,151). Bei Mäusen mit einer erhöhten Produktion von ungesättigten Fettsäuren stellte man eine geminderte Entzündungsreaktion und Transmigration von Leukozyten in der BAL fest. Diese und weitere Hinweise, die darauf hindeuten, dass die Zufuhr von Ω-3-Fettsäuren zu einer verbesserten Kontrolle von Entzündungsreaktionen führen kann, prägte den Begriff der „Immunonutrition“ (152). Dieser Begriff ist ein Ausdruck dafür, dass man die Aktivität des Immunsystems durch Intervention mit spezifischen Nährstoffen modulieren kann.

Im Gegensatz zu den vielen Studien, die sich mit der Applikation von EPA oder Resolvinen auseinandergesetzt haben, gibt es nur wenige, die die Wirkung einer Behandlung mit dem Resolvin-Stoffwechselintermediat 18R-HEPE bei entzündlichen Prozessen analysiert haben. Im Mausmodell führte sowohl die intravenöse als auch die subkutane Applikation von 18R-HEPE zu einer Reduktion der Infiltration von Leukozyten und besaß eine apoptotische Wirkung (Dissertation Reichert, M., 2015) (57,135). Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse konnten dies nicht bestätigen. Die subkutane Applikation von 18R-HEPE führte in unseren Experimenten zu einer tendenziell proinflammatorischen, die Transmigration fördernde Aktivierung von PMN und Lymphozyten. Gleichzeitig kam es zu einem Rückgang der Anzahl der Makrophagen. Außerdem fiel der Effekt in Lunge und BAL unterschiedlich aus und war schlecht reproduzierbar. Um eine eindeutige Aussage über die Intervention mit 18R-HEPE bei pulmonalen Entzündungen treffen zu können, müsste man die hier beschriebenen Experimente unter Verwendung einer parenteralen Applikationsform wiederholen.

5 Zusammenfassung

Das akute Atemnotsyndrom (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) umschreibt ein lebensbedrohliches Krankheitsbild der Lunge, dem unterschiedliche Ursachen und pathophysiologische Mechanismen zugrunde liegen. Durch ein inflammatorisch induziertes Lungenödem kann es bei dieser Erkrankung zu einer hyperkapnischen respiratorischen Insuffizienz kommen, die mit einer massiv eingeschränkten Oxygenierung einhergehen kann. Selbst bei optimaler Therapie ist die Letalität beim ARDS noch immer sehr hoch. Bisweilen steht als kausale Behandlung die Ursachenbehebung im Vordergrund. Klinische Studien konnten zwar bei intensivpflichtigen Patienten/innen die Wirksamkeit von Lipidinfusionen mit einem hohen Ω-3-Fettsäuren-Anteil beschreiben, allerdings gibt es derzeit noch keine weiteren konkreten medikamentösen Therapieansätze zur Immunregulation.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathophysiologie des ARDS zu leisten und die Wirksamkeit von Derivaten der Ω-3-Fettsäure zu untersuchen.

Der ChemR23-Rezeptor ist ein multifunktioneller Rezeptor, der je nach Interaktion divergierende, bisher noch nicht ganz geklärte Signaltransduktionswege initialisiert. Unter anderem ist er für die „chemokinvermittelte Chemotaxis“ mitverantwortlich, indem er in der initialen Inflammationsphase die Transmigration von Leukozyten zu subendothelialen Entzündungsherden moduliert. In der Resolutionsphase kommt es über den ChemR23-Rezeptor zu einer gehemmten Zytokinexpression mit einer antiinflammatorischen Wirkung. Bei einem Defekt dieses Genes wird daher davon ausgegangen, dass es zu einer verminderten Transmigration von Leukozyten kommt und zu einer verbesserten Resolution von Entzündungsherden.

In dieser Arbeit wurde in der Wildtyp- und ChemR23-KO-Maus ARDS mittels Gabe von Lipopolysacchariden (LPS) induziert und die immunmodulatorischen Effekte von Resolvin E1, einem Derivat der mehrfach ungesättigten Ω-3-Fettsäure Eicosapentaensäure (18R-HEPE), untersucht. Für uns relevant war die Fragestellung, ob durch die Gabe der Resolvin-Vorstufe 18R-HEPE eine verbesserte Resolution der Entzündungsprozesse in beiden Mausgruppen erfolgt und ob 18R-HEPE einen Effekt auf Apoptose und Nekrose von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ausübt. Hierfür wurden durchflusszytometrisch die leukozytären Zellzahlen in der Lunge und in der bronchoalveolären Lavage bestimmt.

Tatsächlich wurden, abgesehen von der bereits bekannten LPS-induzierten Leukozytenmigration, Effekte durch die Applikation von 18R-HEPE beobachtet. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung auf die immunmodulatorischen Eigenschaften von Resolvin E1 zurückzuführen sind und die Auflösung der Entzündungsprozesse bzw. die Rückkehr zur Gewebshomöostase begünstigen. Inwieweit man die gemessenen Effekte gezielt therapeutisch einsetzen kann, muss durch weitere grundlegende Untersuchungen bestätigt werden.

6 Summary

The acute respiratory distress syndrome (ARDS) describes a life-threatening clinical picture of the lungs, which is based on different causes and pathophysiological mechanisms. In this disease, inflammation-induced pulmonary oedema can lead to hypercapnic respiratory insufficiency, which can be accompanied by severely restricted oxygenation. Even with optimal therapy, the mortality rate in ARDS is still very high. Causal treatment is sometimes focussed on eliminating the cause. Although clinical studies have described the effectiveness of lipid infusions with a high proportion of Ω-3 fatty acids in patients requiring intensive care, there are currently no other specific drug therapy approaches for immune regulation. The aim of this doctoral thesis was to contribute to a better understanding of the pathophysiology of ARDS and to investigate the efficacy of derivatives of the Ω-3 fatty acid. The ChemR23 receptor is a multifunctional receptor that, depending on the interaction, initialises divergent signal transduction pathways that have not yet been fully clarified. Among other things, it is jointly responsible for "chemokine-mediated chemotaxis" by modulating the transmigration of leukocytes to subendothelial centres of inflammation in the initial inflammation phase. In the resolution phase, the ChemR23 receptor leads to inhibited cytokine expression with an anti-inflammatory effect. It is therefore assumed that a defect in this gene leads to reduced transmigration of leukocytes and improved resolution of inflammatory centres. In this study, ARDS was induced in wild-type and ChemR23-KO mice by administration of lipopolysaccharides (LPS) and the immunomodulatory effects of resolvin E1, a derivative of the polyunsaturated Ω-3 fatty acid eicosapentaenoic acid (18R-HEPE), were investigated. The relevant question for us was whether the administration of the resolvin precursor 18R-HEPE leads to an improved resolution of inflammatory processes in both groups of mice and whether 18R-HEPE has an effect on apoptosis and necrosis of neutrophil granulocytes and macrophages. For this purpose, the leukocyte cell counts in the lungs and in the bronchoalveolar lavage were determined by flow cytometry.In fact, apart from the already known LPS-induced leukocyte migration, effects were observed by the application of 18R-HEPE. Our results show that the effects are due to the immunomodulatory properties of resolvin E1 and favour the resolution of inflammatory processes and the return to tissue homeostasis. The extent to which the measured effects can be used therapeutically in a targeted manner must be confirmed by further fundamental investigations.

7 Bibliographie

7.1 Wissenschaftliche Artikel

1. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. J Clin Invest. 2012 Aug 1;122(8):2731–40.
2. Esteban A, Fernández-Segoviano P, Frutos-Vivar F, Aramburu JA, Nájera L, Ferguson ND, Alía I, Gordo F, Ríos F. Comparison of clinical criteria for the acute respiratory distress syndrome with autopsy findings. Ann Intern Med. 2004 Sep 21;141(6):440.
3. Dembinski R, Mielck F. ARDS – Ein Update – Teil 1: Epidemiologie, Pathophysiologie und Diagnostik. AINS - Anästhesiologie · Intensivmed · Notfallmedizin· Schmerztherapie. 2018 Feb 9;53(02):102–11.
4. Walmrath D, Grimminger F, Seeger W. Therapie des ARDS. Intensivmed und Notfallmedizin. 1999 Apr 7;36(2):104–25.
5. Ranieri V, Rubenfeld G, Thompson B, Ferguson N, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute Respiratory Distress Syndrome. JAMA. 2012 Jun 20;307(23).
6. Hecker M, Weigand MA, Mayer K. Akute respiratorische Insuffizienz. Internist (Berl). 2012 May 12;53(5):557–66.
7. Ott J, Hiesgen C, Mayer K. Lipids in critical care medicine. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2011 Nov;85(5):267-73.
8. Serhan CN, Chiang N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. Br J Pharmacol. 2008 Mar;153(S1):S200–15.
9. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2008 Feb 1;3(1):279–312.
10. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nat Rev Immunol. 2008 May;8(5):349–61.
11. D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, West EE, Willett MH, Britos MF, Pipeling MR, Brower RG, Tuder RM, McDyer JF, King LS. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. J Clin Invest. 2009 Oct 1;119(10):2898–913.

12. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, Van Dyke TE. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. J Immunol. 2007 Nov 15;179(10):7021–9.
13. Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, Flower RJ, Perretti M, Serhan CN. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. Nature. 2009 Oct 29;461(7268):1287-91.
14. Ware LB, Matthay MA. Clinical practice. Acute pulmonary edema. N Engl J Med. 2005 Dec 29;353(26):2788-96.
15. Abraham E, Andrews P, Antonelli M, Brochard L, Brun-Buisson C, Dobb G, Fagon JY, Groeneveld J, Mancebo J, Metnitz P, Nava S, Pinsky M, Radermacher P, Ranieri M, Richard C, Tasker R, Vallet B. Year in review in Intensive Care Medicine-2003. Part 1: Respiratory failure, infection and sepsis. Intensive Care Med. 2004 Jun;30(6):1017-31.
16. Andonegui G, Bonder CS, Green F, Mullaly SC, Zbytnuik L, Raharjo E, Kubes P. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. J Clin Invest. 2003 Apr;111(7):1011-20.
17. Ganter MT, Ware LB, Howard M, Roux J, Gartland B, Matthay MA, Fleshner M, Pittet JF. Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006 Sep;291(3):L354-61.
18. Herzog E, Byrne HJ, Casey A, Davoren M, Lenz AG, Maier KL, Duschl A, Oostingh GJ. SWCNT suppress inflammatory mediator responses in human lung epithelium in vitro. Toxicol Appl Pharmacol. 2009 Feb 1;234(3):378-90.
19. Parker JC, Townsley MI. Evaluation of lung injury in rats and mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Feb;286(2):L231-46.
20. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Sep;291(3):H985-1002.
21. Seeger W, Menger M, Walmrath D, Becker G, Grimminger F, Neuhof H. arachidonic acid lipoxygenase pathways and increased vascular permeability in isolated rabbit lungs. Am Rev Respir Dis. 1987 Oct;136(4):964–72.
22. Tonks AJ, Tonks A, Morris RHK, Jones KP, Jackson SK. Regulation of platelet-activating factor synthesis in human monocytes by dipalmitoyl

phosphatidylcholine. J Leukoc Biol. 2003 Jul;74(1):95–101.

23. Beck-Schimmer B, Schwendener R, Pasch T, Reyes L, Booy C, Schimmer RC. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. Respir Res. 2005 Dec 22;6(1):61.
24. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. J Biol Chem. 11989 Jun 25;264(18):10867-71.
25. Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR, Eun JS. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. J Dairy Sci. 2003 Oct;86(10):3128-37.
26. Goyert SM, Ferrero EM, Seremetis S V., Winchester RJ, Silver J, Mattison AC. Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens. J Immunol. 1986 Dec 15;137(12):3909-14.
27. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science. 1990 Sep 21;249(4975):1431-3.
28. Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. J Immunol. 1988 Jul 15;141(2):547-52.
29. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. Lab Invest. 2006 Jan;86(1):9-22.
30. Nadeau S, Rivest S. Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor κ B activity in the brain during endotoxemia. J Neurosci. 2000 May 1;20(9):3456-68.
31. Poynter ME, Irvin CG, Janssen-Heininger YMW. A prominent role for airway epithelial nf-κb activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. J Immunol. 2003 Jun 15;170(12):6257-65.
32. Aghdassi AA, Mayerle J, Christochowitz S, Weiss FU, Sendler M, Lerch MM. Animal models for investigating chronic pancreatitis. Fibrogenesis and Tissue Repair. 2011 Dec 1;4(1):26.
33. Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS, Serhan CN. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. Proc Natl Acad Sci. 2005 May 24;102(21):7671–6.

34. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. N Engl J Med. 2000 Nov 16;343(20):1467-76.
35. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. J Pathol. 2004 Feb;202(2):145-56.
36. Mayer K, Kiessling A, Ott J, Schaefer MB, Hecker M, Henneke I, Schulz R, Günther A, Wang J, Wu L, Roth J, Seeger W, Kang JX. Acute lung injury is reduced in fat-1 mice endogenously synthesizing n-3 fatty acids. Am J Respir Crit Care Med. 2009 Mar 15;179(6):474–83.
37. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity. Cell. 1991 Dec 20;67(6):1033-6.
38. Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. Liver Int. 2006 Oct;26(8):912-9.
39. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat Rev Immunol. 2007 Sep;7(9):678–89.
40. Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong J-P. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:381-410.
41. Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. Nat Immunol. 2004 Apr;5(4):393-400.
42. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. J Exp Med. 2006 Nov 27;203(12):2569–75.
43. Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. Curr Opin Hematol. 2010 Jan;17(1):9–17.
44. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. J Exp Med. 1998 Mar 16;187(6):903-15.
45. Döcke S, Lock JF, Birkenfeld AL, Hoppe S, Lieske S, Rieger A, Raschzok N, Sauer IM, Florian S, Osterhoff MA, Heller R, Herrmann K, Lindenmüller S, Horn P, Bauer M, Weickert MO, Neuhaus P, Stockmann M, Möhlig M, Pfeiffer AF, von Loeffelholz C. Elevated hepatic chemerin mRNA expression in human non-alcoholic fatty liver disease. Eur J Endocrinol. 2013 Oct 1;169(5):547-57.
46. Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG. Processing, signaling, and

physiological function of chemerin. IUBMB Life. 2014 Jan;66(1):19–26.

47. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. Endocrinology. 2007 Oct;148(10):4687-94.
48. Chamberland JP, Berman RL, Aronis KN, Mantzoros CS. Chemerin is expressed mainly in pancreas and liver, is regulated by energy deprivation, and lacks day/night variation in humans. Eur J Endocrinol. 2013 Oct;169(4):453–62.
49. Arita M, Ohira T, Sun Y-P, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. J Immunol. 2007 Mar 15;178(6):3912–7.
50. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. J Biol Chem. 2007 Sep 21;282(38):28175-88.
51. Yoshimura T, Oppenheim JJ. Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C–C motif) receptor-like 2 (CCRL2); Two multifunctional receptors with unusual properties. Exp Cell Res. 2011 Mar;317(5):674–84.
52. Bondue B, Wittamer V, Parmentier M. Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism. Cytokine Growth Factor Rev. 2011 Oct;22(5–6):331–8.
53. Cash JL, Hart R, Russ A, Dixon JP, Colledge WH, Doran J, Hendrick AG, Carlton MB, Greaves DR. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. J Exp Med. 2008 Apr 14;205(4):767-75.
54. Flower RJ, Perretti M. Controlling inflammation. J Exp Med. 2005 Mar 7;201(5):671-4.
55. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. EMBO Mol Med. 2013 May 17;5(5):661–74.
56. Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. Science. 2013 Jan 11;339(6116):166-72.
57. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2–nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. J Exp Med. 2000 Oct 16;192(8):1197–204.
58. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation

and regulation of innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol. 2011 Jul 25;11(8):519-31.

59. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. J Innate Immun. 2010;2(3):216-27.

60. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-β, PGE2, and PAF. J Clin Invest. 1998 Feb 15;101(4):890-8.

61. Michlewska S, Dransfield I, Megson IL, Rossi AG. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: Key role for TNF-α. FASEB J. 2009 Mar;23(3):844-54.

62. Mayer K, Schaefer MB, Seeger W. Fish oil in the critically ill: from experimental to clinical data. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2006 Mar;9(2):140-8.

63. O'Connor JP, Manigrasso MB, Kim BD, Subramanian S. Fracture healing and lipid mediators. Bonekey Rep. 2014 Apr 2;3:517.

64. Bulger EM, Maier RV. Lipid mediators in the pathophysiology of critical illness. Crit Care Med. 2000 Apr;28(4 Suppl):N27-36.

65. Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002 Aug;68-69:165-75.

66. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J. 1998 Sep;12(12):1063-73.

67. Heller A, Koch T, Schmeck J, van Ackern K. Lipid mediators in inflammatory disorders. Drugs. 1998 Apr;55(4):487-96.

68. Holtzman MJ. Arachidonic acid metabolism: implications of biological chemistry for lung function and disease. Am Rev Respir Dis. 1991 Jan;143(1):188–203.

69. Weller PF, Lee CW, Foster DW, Corey EJ, Austen KF, Lewis RA. Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: Predominant production of leukotriene C 4. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Dec;80(24):7626-30.

70. Grimminger F, Durr U, Seeger W. Ligand-operated synthesis of 4-series and 5-series leukotrienes in human neutrophils: Critical dependence on exogenous free

fatty acid supply. Mol Pharmacol. 1992;41(4):757–66.

71. Calder PC. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. Braz J Med Biol Res. 1998 Apr;31(4):467-90.
72. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. Am J Clin Nutr. 2006 Jun;83(6 Suppl):1505S-1519S.
73. Calder PC. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. Eur J Pharmacol. 2011 Sep;668:S50–8.
74. Calder PC, Yaqoob P. Marine omega-3 fatty acids and coronary heart disease. Curr Opin Cardiol. 2012 Jul;27(4):412-9.
75. Waitzberg DL, Torrinhas RS. Fish oil lipid emulsions and immune response: what clinicians need to know. Nutr Clin Pract. 2009 Aug-Sep;24(4):487-99.
76. Calder PC. Long-chain fatty acids and inflammation. Proc Nutr Soc. 2012 May 28;71(2):284–9.
77. Martin JM, Stapleton RD. Omega-3 fatty acids in critical illness. Nutr Rev. 2010 Aug 26;68(9):531–41.
78. Endres, S., Fülle, H.J., Sinha, B., Stoll, D., Gerzer, R. (1993). Regulation of cytokine synthesis through cyclic nucleotides. In: Faist, E., Meakins, J.L., Schildberg, F.W. Host defense dysfunction in trauma, shock and sepsis. Springer, Berlin, Heidelberg
79. Calder PC. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids. 2007 Nov;77(5–6):327–35.
80. Yaqoob P, Calder PC. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. Br J Nutr. 2007 Oct;98 Suppl 1:S41-5.
81. Müller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, Yu RY, van der Giezen M, Tielens AG, Martin WF. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. Microbiol Mol Biol Rev. 2012 Jun;76(2):444-95.
82. Colasante C, Chen J, Ahlemeyer B, Baumgart-vogt E. Peroxisomes in cardiomyocytes and the peroxisome / peroxisome proliferator-activated receptor-loop. Thromb Haemost. 2015;113(3):452–63.
83. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL. Resolvins. J Exp Med . 2002 Oct 21;196(8):1025–37.
84. Haworth O, Levy BD. Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation. Eur Respir J. 2007 Nov 1;30(5):980–92.

85. Serhan CN. Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2005 Mar;8(2):115–21.
86. Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac R-L, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. J Biol Chem. 2003 Apr;278(17):14677–87.
87. Yang M, Bair JA, Hodges RR, Serhan CN, Dartt DA. Resolvin E1 reduces leukotriene B4–Induced intracellular calcium increase and mucin secretion in rat conjunctival goblet cells. Am J Pathol . 2020 Sep;190(9):1823–32.
88. Arita M, Ohira T, Sun Y-P, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. J Immunol. 2007 Mar 15;178(6):3912–7.
89. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. J Immunol . 2005 May 1;174(9):5884c – 5884.
90. Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez JM, Chiang N, Serhan CN, Bazan NG. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. J Biol Chem. 2003 Oct;278(44):43807–17.
91. Ishii S, Nagase T, Tashiro F, Ikuta K, Sato S, Waga I, Kume K, Miyazaki J, Shimizu T. Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. EMBO J. 1997 Jan 2;16(1):133-42.
92. Mayer K, Kiessling A, Ott J, Schaefer MB, Hecker M, Henneke I, Schulz R, Günther A, Wang J, Wu L, Roth J, Seeger W, Kang JX. Acute lung injury is reduced in fat-1 mice endogenously synthesizing n-3 fatty acids. Am J Respir Crit Care Med. 2009 Mar 15;179(6):474–83.
93. Schaefer MB, Ott J, Mohr A, Bi MH, Grosz A, Weissmann N, Ishii S, Grimminger F, Seeger W, Mayer K. Immunomodulation by n-3- versus n-6-rich lipid emulsions in murine acute lung injury—Role of platelet-activating factor receptor. Crit Care Med. 2007 Feb;35(2):544–54.
94. Szarka RJ, Wang N, Gordon L, Nation P, Smith RH. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. J Immunol Methods. 1997 Mar;202(1):49–57.
95. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. Am

J Physiol Cell Mol Physiol. 2008 Sep;295(3):L379–99.

96. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Feb;151(2 Pt 1):293-301.

97. Eickmeier O, Hilberath J, Zielen S, Haworth O. Die Rolle neuer „pro-resolving" Lipidmediatoren bei entzündlichen Lungenerkrankungen. Pneumologie. 2011 Mar 29;65(03):149–58.

98. Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P. N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. Cell Immunol. 1992 Apr;140(2):390-9.

99. Gatti S, Faggioni R, Echtenacher B, Ghezzi P. Role of tumour necrosis factor and reactive oxygen intermediates in lipopolysaccharide-induced pulmonary oedema and lethality. Clin Exp Immunol. 2008 Jun 28;91(3):456–61.

100. Chen H, Bai C, Wang X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. Expert Rev Respir Med. 2010 Dec 9;4(6):773–83.

101. O'Grady NP, Preas HL, Pugin J, Fiuza C, Tropea M, Reda D, Banks SM, Suffredini AF. Local inflammatory responses following bronchial endotoxin instillation in humans. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Jun;163(7):1591-8.

102. Sandström T, Bjermer L, Rylander R. Lipopolysaccharide (LPS) inhalation in healthy subjects increases neutrophils, lymphocytes and fibronectin levels in bronchoalveolar lavage fluid. Eur Respir J. 1992 Sep;5(8):992-6.

103. Jagielo PJ, Thorne PS, Watt JL, Frees KL, Quinn TJ, Schwartz DA. Grain dust and endotoxin inhalation challenges produce similar inflammatory responses in normal subjects. Chest. 1996 Jul;110(1):263-70.

104. Heitmann S, Tschernig T, Larbig M, Steinmetz I, Hedrich H-J, Pabst R. Immunohistological characterization of leukocytes in the lungs of healthy mice and after bacterial intratracheal infection. Lab Anim. 1999 Jul 1;33(3):288–94.

105. Bi MH, Ott J, Fischer T, Hecker M, Dietrich H, Schaefer MB, Markart P, Wang BE, Seeger W, Mayer K. Induction of lymphocyte apoptosis in a murine model of acute lung injury-modulation by lipid emulsions. Shock. 2010 Feb;33(2):179-88.

106. Wang HM, Bodenstein M, Markstaller K. Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. Eur Surg Res . 2008;40(4):305–16.

107. Ulich TR, Yin S, Guo K, Yi ES, Remick D, del Castillo J. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. Am J Pathol. 1991 May;138(5):1097-101.
108. De Souza Xavier Costa N, Ribeiro Júnior G, Dos Santos Alemany AA, Belotti L, Zati DH, Frota Cavalcante M, Matera Veras M, Ribeiro S, Kallás EG, Nascimento Saldiva PH, Dolhnikoff M, Ferraz da Silva LF. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. PLoS One. 2017 Sep 27;12(9):e0185474.
109. Cash JL, Hart R, Russ A, Dixon JP, Colledge WH, Doran J, Hendrick AG, Carlton MB, Greaves DR. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. J Exp Med. 2008;205(4):767–75.
110. Hecker M, Linder T, Ott J, Walmrath HD, Lohmeyer J, Vadász I, Marsh LM, Herold S, Reichert M, Buchbinder A, Morty RE, Bausch B, Fischer T, Schulz R, Grimminger F, Witzenrath M, Barnes M, Seeger W, Mayer K. Immunomodulation by lipid emulsions in pulmonary inflammation: a randomized controlled trial. Crit Care. 2015 May 12;19(1):226.
111. Demoor T, Bracke KR, Dupont LL, Plantinga M, Bondue B, Roy MO, Lannoy V, Lambrecht BN, Brusselle GG, Joos GF. The role of ChemR23 in the induction and resolution of cigarette smoke-induced inflammation. J Immunol. 2011 May 1;186(9):5457-67.
112. Hart R, Greaves DR. Chemerin contributes to inflammation by promoting macrophage adhesion to VCAM-1 and fibronectin through clustering of VLA-4 and VLA-5. J Immunol. 2010 Sep 15;185(6):3728–39.
113. Zabel BA, Zuniga L, Ohyama T, Allen SJ, Cichy J, Handel TM, Butcher EC. Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response. Exp Hematol. 2006 Aug;34(8):1021-32.
114. Hyun Y, Hong C. Deep insight into neutrophil trafficking in various organs. J Leukoc Biol. 2017;102(3):617–29.
115. D'Ambrosio D, Mariani M, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Oct 1;164(7):1266–75.
116. Gane J, Stockley R. Mechanisms of neutrophil transmigration across the vascular endothelium in COPD. Thorax. 2012 Jun;67(6):553–61.
117. Rossaint J, Berger C, Van Aken H, Scheld HH, Zahn PK, Rukosujew A, Zarbock

A. Cardiopulmonary bypass during cardiac surgery modulates systemic inflammation by affecting different steps of the leukocyte recruitment cascade. PLoS One. 2012;7(9):e45738.

118. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. Immunity. 2014 Nov 20;41(5):694-707.
119. Provoost S, De Grove KC, Fraser GL, Lannoy VJ, Tournoy KG, Brusselle GG, Maes T, Joos GF. Pro- and anti-inflammatory role of ChemR23 signaling in pollutant-induced inflammatory lung responses. J Immunol . 2016 Feb 15;196(4):1882–90.
120. Peavy DL, Baughn RE, Musher DM. Mitogenic activity of bacterial lipopolysaccharides in vivo: morphological and functinal characterization of responding cells. Infect Immun. 1978 Jan;19(1):71-8.
121. O'Malley J, Matesic LE, Zink MC, Strandberg JD, Mooney ML, De Maio A, Reeves RH. Comparison of acute endotoxin-induced lesions in A/J and C57BL/6J mice. J Hered. 1998 Nov-Dec;89(6):525-30.
122. Wells AU, Hirani N. Interstitial lung disease guideline. Thorax. 2008 Sep 1;63(Supplement5):v1–58.
123. Driscoll KE. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. Exp Lung Res. 1994 Jan 2;20(6):473–90.
124. Wolpe D. Macrophage members inflammatory of a novel proteins superfamily of cytokines. FASEB J. 1989 Dec;3(14):2565-73.
125. Teague WE, Dobson GP. Thermodynamics of the arginine kinase reaction. J Biol Chem. 1999;274(32):22459–63.
126. Grigg JM, Silverman M, Savill JS, Sarraf C, Haslett C. Neutrophil apoptosis and clearance from neonatal lungs. Lancet. 1991 Sep;338(8769):720–2.
127. Oh SF, Dona M, Fredman G, Krishnamoorthy S, Irimia D, Serhan CN. Resolvin E2 formation and impact in inflammation resolution. J Immunol. 2012 May 1;188(9):4527-34.
128. Levy BD. Resolvin D1 and resolvin E1 promote the resolution of allergic airway inflammation via shared and distinct molecular counter-regulatory pathways. Front Immunol. 2012;3(DEC):1–10.
129. Uddin M, Levy BD. Resolvins: Natural agonists for resolution of pulmonary inflammation. Prog Lipid Res. 2011 Jan;50(1):75–88.
130. Duvall MG, Levy BD. DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins

in airway inflammation. Eur J Pharmacol. 2016 Aug;785:144–55.

131. Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. J Clin Invest. 2018 Jul 2;128(7):2657-2669.

132. Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. J Exp Med. 2000 Aug 7;192(3):421-32.

133. Tjonahen E, Oh SF, Siegelman J, Elangovan S, Percarpio KB, Hong S, Arita M, Serhan CN. Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. Chem Biol. 2006 Nov;13(11):1193-202.

134. IIsobe Y, Arita M, Matsueda S, Iwamoto R, Fujihara T, Nakanishi H, Taguchi R, Masuda K, Sasaki K, Urabe D, Inoue M, Arai H. Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid. J Biol Chem. 2012 Mar 23;287(13):10525-10534.

135. Hecker M, Sommer N, Foch S, Hecker A, Hackstein H, Witzenrath M, Weissmann N, Seeger W, Mayer K. Resolvin E1 and its precursor 18R-HEPE restore mitochondrial function in inflammation. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids. 2018 Sep;1863(9):1016–28.

136. Campbell EL, Louis NA, Tomassetti SE, Canny GO, Arita M, Serhan CN, Colgan SP. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. FASEB J. 2007 Oct;21(12):3162-70.

137. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. Nature. 2007 Jun;447(7146):869–74.

138. Seki H, Fukunaga K, Arita M, Arai H, Nakanishi H, Taguchi R, Miyasho T, Takamiya R, Asano K, Ishizaka A, Takeda J, Levy BD. The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. J Immunol. 2010 Jan 15;184(2):836-43.

139. Dona M, Fredman G, Schwab JM, Chiang N, Arita M, Goodarzi A, Cheng G, von Andrian UH, Serhan CN. Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. Blood. 2008 Aug 1;112(3):848-55.

140. Haworth O, Cernadas M, Yang R, Serhan CN, Levy BD. Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-γ and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic

airway inflammation. Nat Immunol. 2008 Aug 22;9(8):873–9.

141. Unno Y, Sato Y, Fukuda H, Ishimura K, Ikeda H, Watanabe M, Tansho-Nagakawa S, Ubagai T, Shuto S, Ono Y. Resolvin E1, but not resolvins E2 and E3, promotes fMLF-induced ROS generation in human neutrophils. FEBS Lett. 2018 Aug;592(16):2706-2715.
142. Haslett C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. Br Med Bull. 1997;53(3):669–83.
143. Herold S, Mayer K, Lohmeyer J. Acute Lung Injury: How Macrophages Orchestrate Resolution of Inflammation and Tissue Repair. Front Immunol. 2011;2(Nov):1–13.
144. Cocco RE, Ucker DS. Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure. Mol Biol Cell. 2001 Apr;12(4):919-30.
145. Cash JL, Christian AR, Greaves DR. Chemerin Peptides Promote Phagocytosis in a ChemR23- and Syk-Dependent Manner. J Immunol. 2010 May 1;184(9):5315–24.
146. El Kebir D, Gjorstrup P, Filep JG. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. Proc Natl Acad Sci. 2012 Sep 11;109(37):14983–8.
147. Filep JG. Targeting neutrophils for promoting the resolution of inflammation. Front Immunol. 2022 Mar 16;13:866747.
148. Erwig LP, Gordon S, Walsh GM, Rees AJ. Previous uptake of apoptotic neutrophils or ligation of integrin receptors downmodulates the ability of macrophages to ingest apoptotic neutrophils. Blood. 1999 Feb 15;93(4):1406-12.
149. Liu CY, Liu YH, Lin SM, Yu CT, Wang CH, Lin HC, Lin CH, Kuo HP. Apoptotic neutrophils undergoing secondary necrosis induce human lung epithelial cell detachment. J Biomed Sci. 2003 Nov-Dec;10(6 Pt 2):746-56.
150. Gadek JE, DeMichele SJ, Karlstad MD, Pacht ER, Donahoe M, Albertson TE, Van Hoozen C, Wennberg AK, Nelson JL, Noursalehi M. Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. Enteral Nutrition in ARDS Study Group. Crit Care Med. 1999 Aug;27(8):1409-20.
151. Pacht ER, DeMichele SJ, Nelson JL, Hart J, Wennberg AK, Gadek JE. Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, γ-linolenic acid, and antioxidants reduces

alveolar inflammatory mediators and protein influx in patients with acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med. 2003 Feb;31(2):491–500.

152. Mayer K, Fegbeutel C, Hattar K, Sibelius U, Krämer HJ, Heuer KU, Temmesfeld-Wollbrück B, Gokorsch S, Grimminger F, Seeger W. Omega-3 vs. omega-6 lipid emulsions exert differential influence on neutrophils in septic shock patients: impact on plasma fatty acids and lipid mediator generation. Intensive Care Med. 2003 Sep;29(9):1472-81.

7.2 Doktorarbeiten

Ott, J.R., Einfluss von n-3-versus n-6-basierten Lipidemulsionen für die parenterale Ernährung auf den Verlauf eines akuten Lungenversagens der Maus. 2008.

Reichert, M., Die Wirkung der Resolvin E1-Vorstufe 18R-hydro(pero)xy-5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 16E-Eicosapentaensäure und des Leukotrien B4 Rezeptors 1 in einem murinen Modell des akuten Lungenversagens. 2015.

8 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichen oder nichtöffentlichen Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

_____ _____

Ort/Datum Unterschrift

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Insbesondere meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Konstantin Mayer danke ich für das interessante Thema und die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich ausdrücklich bei Dr. med. vet. Juliane Ott, Dr. med. vet. Anja Buchbinder, Andrea Mohr, Brigitte Taborski und Juliane Mest für ihre große Hilfsbereitschaft und den konstruktiven Ratschlägen.

Meinen herzlichen Dank gilt meiner geliebten Familie, ohne deren Hilfe ich diese Arbeit kaum hätte bewältigt können!