

**Endotoxintoleranz und Kreuztoleranz:
Die Rolle der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase
für die Hämoxygenase-1-vermittelte Lungenprotektion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Carina Maria Tidden

aus Wesel

2015

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Baumgarten
2. Gutachter: PD Dr. med. O. Dewald

Tag der Mündlichen Prüfung: 31.03.2015

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. A. Hoeft

Für meine Eltern
Annette und Johannes Niehaus-Tidden

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	11
1.1 Sepsis	11
1.1.1 Epidemiologie der Sepsis	11
1.1.2 Sepsisbegriff	11
1.1.3 Sepsis und ARDS	13
1.2 Molekulare Mechanismen der Sepsis	16
1.2.1 Angeborenes Immunsystem	16
1.2.2 <i>Toll-like</i> Rezeptor-abhängige Signaltransduktion	20
1.2.3 Endotoxintoleranz und Kreuztoleranz: Das <i>Two-Hit</i> -Modell	23
1.2.4 Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)	25
1.2.5 Hämoxxygenase (HO)-1	28
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	31
2. Material und Methoden	32
2.1 Zeitlicher Ablauf der Versuchsreihe	32
2.2 Versuchstiere	34
2.3 Verifizierung der Reinheit der verwendeten PAMP	35
2.3.1 Reinheit von LPS	35
2.3.2 Reinheit von LTA und PepG	35
2.4 Tierversuche zur iNOS-Funktion und -Inhibition	36
2.5 Tierversuche zur Endotoxin- und Kreuztoleranz	37
2.5.1 Tierversuche zur Sterblichkeit	37
2.5.2 Tierversuche zur Lungenprotektion	38
2.6 Bestimmung von Nitrat und Nitrit	40
2.6.1 Griess Assay	40
2.7 Relative Quantifizierung des Proteingehalts einer Gewebeprobe	43
2.7.1 Homogenisierung	43
2.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford	46
2.7.3 Gelelektrophorese	48
2.7.4 <i>Western Blot</i>	52

2.7.5	Immundetektion	55
2.8	Myeloperoxidase Aktivitätsassay.....	57
2.9	<i>Wet-to-dry ratio</i>	59
2.10	Statistik	60
3.	Ergebnisse.....	61
3.1	iNOS-Funktion und -Inhibition	61
3.2	Endotoxintoleranz (ET).....	63
3.2.1	Kreislaufparameter und Sterblichkeit im Rahmen der Endotoxintoleranz	63
3.2.2	Lungenprotektion im Rahmen der Endotoxintoleranz	64
3.3	Kreuztoleranz (KT)	69
3.3.1	Kreislaufparameter und Sterblichkeit im Rahmen der Kreuztoleranz.....	69
3.3.2	Lungenprotektion im Rahmen der Kreuztoleranz.....	71
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	75
4.	Diskussion	76
5.	Zusammenfassung	89
6.	Tabellenverzeichnis.....	90
7.	Abbildungsverzeichnis.....	91
8.	Verzeichnis der verwendeten Materialien.....	92
8.1	Chemikalien.....	92
8.2	Laboraüstung.....	96
8.3	Verbrauchsmaterialien.....	97
9.	Literaturverzeichnis	99
10.	Danksagung	115

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
ALI	<i>acute lung injury</i> , veraltete Untergruppe des akuten Lungenversagens
AP-1	Aktivatorprotein-1 (Transkriptionsfaktor)
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BSA	bovines Serumalbumin
CARS	<i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
C _{RS}	<i>Compliance, Dehnbarkeit der Lunge</i>
CLP	Zökumligatur und -punktion
CO	Kohlenstoffmonoxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin DNA
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	extrazellulär
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Antikoagulation von Blutproben
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ET	Endotoxintoleranz
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
HEK Zellen	<i>human embryonic kidney</i> Zellen, menschliche embryonale Nierenzellen
HMGB 1	<i>high mobility group box 1</i> Protein
HO-1	Hämoxygenase -1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
i.p.	intraperitoneal

IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
I/R	Ischämie und Reperfusion
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
KT	Kreuztoleranz
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid, Wandbestandteil gramnegativer Bakterien
LTA	Lipoteichonsäure, Wandbestandteil grampositiver Bakterien
MAD	Arterieller Mitteldruck
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min.	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule, Einheit des Drucks
MDP	Muramyl Dipeptid
MODS	<i>Multiple organ dysfunction syndrome</i> , Multiorganversagen
MPO	Myeloperoxidase
MPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
n	Anzahl der pro Zeitpunkt und Gruppe untersuchten Tierproben
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>nucleotide oligomerization domain</i>
NO ₂	Nitrit

NO ₃	Nitrat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O ₂ ⁻	Superoxid
ONNO ⁻	Peroxinitrit
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAMP	Pathogen-assoziierte Molekülmuster, <i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PepG	Peptidoglykan, integraler Wandbestandteil von grampositiven Bakterien
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
PRR	Mustererkennungsrezeptoren, <i>Pattern recognition receptor</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalbeschleunigung
RLR	RIG (<i>retinoic acid inducible gene 1</i>)-like receptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies, <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
RS-Virus	Respiratory-Syncytial-Virus
SDS	Dodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SEM	Standardfehler
SHAM	scheinoperierte Gruppe, <i>sham</i> = engl. vorgetäuscht
SIGIRR	kurzes, einzelnes Immunglobulin IL-1-R- verwandtes Molekül
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SnPPiX	Zink-Protoporphyrin IX, selektiver HO-1-Inhibitor
SOCS	Suppressor der Zytokin-Signalübertragung, <i>suppressor of cytokine signaling</i>
ssRNA	Einzelstrang-RNA
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin

TIR-Domäne	Toll-/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TIRAP	Toll-/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne enthaltenes Adapterprotein
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor, <i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TM	Transmembranös
TRAF-6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
TRAM	TRIF zugehöriges Adaptermolekül
TRIF	TIR-Domäne-enhaltendes IFN- β -induzierendes Adaptermolekül
V_E	Expiratorisches Minutenvolumen der Lunge
V_{ECorr}	Annäherung für den funktionellen Totraum der Lunge
VILI	<i>ventilator-induced lung injury</i> , Respirator-assoziiertes Lungenversagen
1400W	1400W, selektiver iNOS-Inhibitor
WTDR	<i>wet-to-dry ratio</i>
ZVK	Zentraler Venenkatheter

1. Einleitung

1.1 Sepsis

1.1.1 Epidemiologie der Sepsis

Erkrankungen des septischen Formenkreises stellen in Deutschland die Haupttodesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen dar. Mit ca. 60.000 Todesfällen gelten sie nach der Koronaren Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt als dritthäufigste Todesursache (Brunkhorst, 2006). Bei zunehmender Therapieausweitung in einem multimorbiden und immer älter werdenden Patientenkollektiv ist, trotz aller Verbesserungen der modernen Intensivmedizin, mit einem weiteren Anstieg der Sepsis-Erkrankungen zu rechnen. Laut Angaben des Statistischen Bundesamtes ist der Anteil der operierten Patienten mit über 65 Lebensjahren bis 2013 auf 41,9 % angestiegen und beträgt aktuell circa 6,62 Millionen Menschen (Statistisches Bundesamt, 2014). Genau dieses Patientengut weist jedoch ein deutlich schlechteres postoperatives Ergebnis mit einer signifikant höheren Morbidität und Letalität auf (Carbajal-Guerrero et al., 2014). Da eine Abnahme der Sepsis-bedingten Sterblichkeitsrate von aktuell 48,4 % nicht zu erwarten ist (Engel et al., 2007), werden auch die mit einem Jahresbudget von 11,7 Milliarden Euro geschätzten (Graf et al., 2007), bereits jetzt schon hohen Kosten für das Gesundheitssystem eher noch weiter steigen.

1.1.2 Sepsisbegriff

Per Definition der Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* von 1992 handelt es sich bei der Sepsis um eine systemische Antwort auf eine Infektion, die die Kriterien für das *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) erfüllt. Hierbei umfasst der ebenfalls neu vorgeschlagene Begriff SIRS alle systemisch-entzündlichen Reaktionen auf nicht-infektiöse Ereignisse. Ein SIRS liegt vor, wenn mindestens 2 der 4 Variablen (Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz oder Leukozytenzahl) in nur geringem Ausmaß verändert sind (Tab. 1) (Bone et al., 1992).

Bis heute sind die aus dieser Definition entstandenen Widersprüchlichkeiten ein großes Problem für Therapiedurchführung und Studienplanung: Bis zu 90 % aller kritisch Kranken zeigen klinische Zeichen eines SIRS oder einer Sepsis (Sprung et al., 2006). Hierbei lassen sich beide Erkrankungen über die oben genannte Definition oft nur schwer voneinander abgrenzen. Häufig kann sich auch auf dem Boden eines SIRS eine Sepsis entwickeln, sodass dann ein fließender Übergang zwischen beiden Entitäten besteht. Der Versuch, dieser Problematik zu begegnen, scheiterte 2001 auf der *International Sepsis Definitions Conference*, die keine wesentlichen Definitionsänderungen beschließen konnte. Um die Diagnose besser absichern zu können, wurden lediglich weitere Parameter zur Sepsis/SIRS Definition hinzugefügt. So gehören heute Gerinnungsstörungen, Erhöhungen des Kreatinins oder des Procalcitonins und das Vorliegen einer hämodynamischen Instabilität zu dem Symptomkomplex septischer Erkrankungen.

Tabelle 1: Definition Sepsis/SIRS mit klinischer Gradeinteilung

Als Sepsis bezeichnet man eine systemische Antwort auf eine Infektion, die die unten genannten Kriterien für das *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) erfüllt. Zur Abstufung des Schweregrades wurden die Begriffe Schwere Sepsis, Septischer Schock und Multiorgan-dysfunktionssyndrom eingeführt. Modifiziert nach Bone et al., 1992 und Levy et al., 2003.

SIRS	Sepsis	Schwere Sepsis	Septischer Schock	MODS**
Systemisch-entzündliche Reaktion auf nicht-infektiöse Ereignisse, charakterisiert durch zwei oder mehr der folgenden Parameter: I. Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C II. Herzfrequenz > 90/min III. Atemfrequenz > 20/min oder p_aCO_2 < 32 mmHg IV. Leukozyten > 12.000/mm ³ oder < 4.000/mm ³ oder > 10 % unreife Formen	SIRS + Infektion	Sepsis + Organdysfunktion und Anzeichen einer Hypoperfusion oder Hypotension wie beispielsweise einer - Laktatazidose - Azidose - Oligurie - oder einer akuten Änderung der Bewusstseinslage	Sepsis mit Schock durch septische Hypotension* trotz adäquater Flüssigkeitsversorgung Der Einsatz von positiv inotropen oder vasopressorischen Substanzen kann die Hypotension verschleiern. *sept. Hypotension: < 90 mmHg _{sys} oder Reduktion ≤ 40 mmHg von Ausgangswert	Akutranke, mit schwer veränderter Organfunktion. Die Homöostase kann nur durch Intervention aufrechterhalten werden **Multiorgan-dysfunktionssyndrom

1.1.3 Sepsis und ARDS

Die Lunge stellt im Rahmen der, während einer Sepsis ablaufenden, inflammatorischen Prozesse ein zentrales und sensibles Schockorgan dar (Dombrovskiy et al., 2007; Engel et al., 2007; Vincent et al., 2006). Etwa 40–60 % aller Sepsis-Patienten entwickeln im Rahmen ihres septischen Krankheitsverlaufes ein Lungenversagen (Engel et al., 2007; Sprung et al., 2006). Die Lungenschädigung wird hierbei durch den Begriff des *acute respiratory distress syndroms* (ARDS) beschrieben.

Die klassische Definition des ARDS wurde 1967 von Ashbaugh et al. erstmals dokumentiert: Das hypoxämische Lungenversagen zeigt nach seiner Beschreibung radiologisch nachweisbare, bilaterale Lungeninfiltrate, denen keine kardiologische Genese zuzuordnen ist.

Die heutige Berlin Definition des ARDS wurde 2012 von der *ARDS-Definition Task Force* unter Beteiligung der *European Society of Intensive Care Medicine*, der *American Thoracic Society* und der *Society of Critical Care Medicine* verfasst und löste die Begriffsfestlegung der *American-European Consensus Conference on ARDS* ab.

In die aktuelle Definition fließen, neben den schon von Ashbaugh beschriebenen Kriterien (Hypoxämie und bilaterale Verdichtungen in der Bildgebung), folgende, für ein ARDS charakteristische Merkmale mit ein: der zeitliche Ablauf, die Respirator-einstellungen, der anhand der *Compliance* gemessene Verlust des Lungenvolumens (C_{RS}) sowie die Erhöhung des funktionellen Totraumes (angenähert durch $V_{E\text{ CORR}}$). Im Gegensatz zu der bis dato verwendeten Auslegung sollen die in der Berlin Definition erstmals enthaltenen, unterschiedlichen ARDS Ausprägungsgrade besser mit der Letalität der betroffenen Patienten korrelieren.

Tabelle 2: Berlin Definition des ARDS

Die 2012 abgefasste Berlin Definition des ARDS definiert dieses hypoxämische Lungenversagen mit Hilfe der 5, in der Tabelle aufgeführten Kriterien. Die Ausprägung der Hypoxämie wird anhand des Verhältnisses zwischen arteriellem Sauerstoffpartialdruck (paO_2) und der Konzentration von Sauerstoff in der eingeatmeten Luft (inspiratorische Sauerstoffkonzentration FiO_2) als Horovitz-Quotient angenähert. ¹⁾ Die Genese des proteinreichen Lungenödems sollte in diesem Symptomkomplex nicht vollständig durch Pleuraergüsse, Atelektasen oder Rundherde erklärbar sein. Im Vergleich zu der alten ARDS-Definition fließen jetzt auch der zeitliche Ablauf, ²⁾ die Respiratoreinstellungen und sonstige physiologische Störungen, wie beispielsweise die Erhöhung des pulmonalen Totraumes und die verminderte Compliance (C_{RS}) der Lunge in die Begriffsfestlegung mit ein. ³⁾ Hierbei ist $V_{E \text{ CORR}} = V_E \times \text{paCO}_2/40$ (korrigiert für Körperoberfläche) als standardisiertes Minutenvolumen bei einem PaCO_2 von 40 mmHg ein Surrogatparameter für den pulmonalen Totraum. Modifiziert nach Force et al., 2012.

ARDS			
	Mild (Mortalität 27 %)	Moderat (Mortalität 32 %)	Schwer (Mortalität 45 %)
Verlauf	Akuter Beginn innerhalb einer Woche nach dem Ereignis		
Hypoxämie (gemessen anhand des Horovitz-Quotienten)	$\text{paO}_2/\text{FiO}_2 : 201-300$ mit $\text{PEEP/CPAP} \geq 5$ ²⁾	$\text{paO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mit $\text{PEEP/CPAP} \geq 5$ ²⁾	$\text{paO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ mit $\text{PEEP/CPAP} \geq 5$ ²⁾
Radiologischer Befund (im CT oder Röntgen des Thorax)	Bilaterale Infiltrate ¹⁾	Bilaterale Infiltrate ¹⁾	Bilaterale Infiltrate über mindestens 3 Quadranten ¹⁾
Genese des Lungenödems	Respiratorisches Versagen nicht ausschließlich durch Herzversagen oder Volumenüberschuss erklärbar. Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zum Ausschluss eines hydrostatischen Ödems, falls kein Risikofaktor vorhanden.		
Zusätzliche physiologische Störungen	keine	keine	$V_{E \text{ CORR}} > 1 \text{ l/min}$ ³⁾ oder $C_{RS} < 40 \text{ ml/cmH}_2\text{O}$

Wie bei der Sepsis ist auch die Definition des ARDS durchaus problematisch, da unterschiedlichste Krankheitsentitäten in diese Gruppen fallen und lediglich durch klinische und bildgebende Parameter unterschieden werden: So kann die Lunge entweder durch ein direkt auf sie einwirkendes Ereignis (Pneumonien, Aspirationen, Traumata) geschädigt werden und dadurch Ausgangsort für eine Sepsis sein, oder aber es erfolgt eine indirekte Schädigung durch eine extrapulmonale, systemisch-entzündliche Reaktion. Diese kann beispielsweise als Folge einer Sepsis, eines extrapulmonalen Traumas oder einer Verbrennung auftreten (Rubenfeld et al., 2005).

In beiden Fällen führt eine überschießende Entzündungsreaktion auch zur Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten (*polymorphonuclear leucocytes*, PMN). Die von ihnen ausgeschütteten, reaktiven Sauerstoff- (*reactive oxygen species*, ROS) und Nitrogenspezies (*reactive nitrogen species*, RNS) können im weiteren Verlauf eine schwere Organschädigung mit Ausbildung eines Lungenversagens nach sich ziehen (Abraham, 2003; Reutershan et al., 2005). Bedingt durch die verschiedenen Kausalitäten für das entstehende ARDS sind zum Teil erhebliche Unterschiede im Krankheitsverlauf zu beobachten. Demzufolge ist eine individuelle Anpassung der Therapie unabdingbar.

Die Problematik einer unscharfen ARDS-Definition spiegelt sich unter anderem in stark divergierenden Angaben zur Letalität wider: So schwanken die Zahlen in einer Metaanalyse studienabhängig zwischen 15 % und 72 % (Zambon und Vincent, 2008). Insgesamt gehen große, aktuelle Metaanalysen von einer krankheitsspezifischen Sterberate zwischen 40 % und 50 % aus (Phua et al., 2009; Villar et al., 2011; Zambon und Vincent, 2008).

Unabhängig hiervon stellt das Lungenversagen in Verbindung mit einer Sepsis ein zusätzliches Risiko für den Patienten dar. Im Vergleich zu anderen Ursachen ist die spezifische Letalität eines Sepsis-assoziierten ARDS deutlich erhöht (Sheu et al., 2010; Vincent et al., 2006): So versterben beispielsweise 36,5 % der Patienten, die ein Pneumonie- oder Aspirations-induziertes ARDS entwickelt haben und sogar nur 11% der Erkrankten, die an einem Trauma-assoziierten ARDS litten. Im Gegensatz dazu überleben 43 % der Sepsis-Patienten, die ein ARDS entwickelt haben, diese schwere Erkrankung nicht (Eisner et al., 2001) .

Analog zur Sepsis tritt auch das Lungenversagen häufiger bei älteren, multimorbiden Patienten auf und ist auch hier mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden. Folglich wird, aufgrund des bereits oben erwähnten demographischen Wandels, mit einer Zunahme der Fallzahlen zu rechnen sein. Dies könnte dazu führen, dass auch die Kosten für die heute bereits 3,6 Millionen mit dem ARDS assoziierten Krankenhaustage pro Jahr noch weiter steigen werden (Rubenfeld et al., 2005).

Für die Entwicklung neuer und innovativer Therapieansätze ist ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden molekularbiologischen Mechanismen dieses hochkomplexen Krankheitsbildes unabdingbar.

1.2 Molekulare Mechanismen der Sepsis

1.2.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist mit nur wenigen Hundert im Genom kodierten Rezeptoren in der Lage, eine große Zahl unterschiedlichster Erreger zu erkennen. Ermöglicht wird diese hocheffiziente Fremd-Eigen-Diskrimination durch sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR). Ihnen zugehörig sind unter anderem die *Toll-like* Rezeptoren (TLR), die *NOD-like* Rezeptoren (NLR) und die *RIG-I-like* Rezeptoren (RLR). Sie binden ubiquitär vorkommende, pathogene Strukturen aus Bakterien, Pilzen und Viren, die sogenannten *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) und aktivieren hierüber die Infektabwehr (Takeuchi und Akira, 2010). Darüber hinaus sind PRR auch in der Lage, durch eine Zellschädigung freigesetzte, Wirts-eigene Komponenten zu binden. Diese klassischerweise als Alarmine bezeichneten Molekülstrukturen werden heute analog zu den PAMP als sogenannte *damage associated molecular patterns* (DAMP) definiert (Bianchi, 2007).

Der bekannteste Vertreter der PAMP ist das Lipopolysaccharid (LPS), ein integrativer Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien. Da sein Entdecker Richard Pfeiffer irrtümlicherweise annahm, das Toxin stamme aus dem Inneren von Bakterien, nannte er es Endotoxin. Diese Bezeichnung wird bis heute als LPS-Synonym verwendet. Gelangt LPS in den menschlichen Organismus, wird es mit Hilfe von 3 Korezeptoren, dem *LPS binding protein* (LBP) (Schumann et al., 1990), dem *cluster of differentiation* (CD) 14

(Wright et al., 1990) und dem MD 2 (Shimazu et al., 1999) von seinem eigentlichen Rezeptor, dem TLR4, gebunden (Poltorak et al., 1998).

Da große, multizentrische Studien in den letzten Jahren eine Verschiebung des septischen Infektionsspektrums zu Gunsten grampositiver Erreger berichteten, gewinnen auch die Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien, namentlich Lipoteichonsäure (LTA), Lipopeptide und Peptidoglykan (PepG) als PAMP eine immer größere Bedeutung (Martin et al., 2003; Vincent et al., 2006; Vincent et al., 2009). Diese werden nicht vom TLR4, sondern zum einen von einem Heterodimer aus TLR2 und TLR6 oder TLR1 (LTA, Lipopeptide) und zum anderen über die *cytosolic nucleotide oligomerisation domain* (NOD)-Rezeptoren 1 und -2 detektiert (Takeuchi und Akira, 2010).

Frühere experimentelle Studien haben die synergistische, pro-inflammatorische Wirkung von LTA und PepG fälschlicherweise einer gemeinsamen Bindung an den TLR2 zugeschrieben (De Kimpe et al., 1995; Schwandner et al., 1999; Thiemermann, 2002). Die Erkenntnis, dass PepG über NOD bindet, weist nun auf deutlich komplexere Mechanismen der synergistischen Wirkung hin.

Die Identifikation eines PAMP durch seinen spezifischen PRR initiiert eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, die das eingehende Signal in den Zellkern transduziert und dort eine veränderte Expression inflammatorischer Mediatoren induziert. Diese Botenstoffe amplifizieren die Immunabwehr abermals (Takeuchi und Akira, 2010).

Neue Forschungsergebnisse zeigen, dass der Ablauf dieser Entzündungsreaktion ein fein abgestimmtes, balanciertes Zusammenwirken von pro- und anti-inflammatorischen Signalkaskaden ist: Die Stimulation der angeborenen Immunantwort führt initial zu einer schnellen Heraufregulation pro-inflammatorischer Mediatoren. Im Folgenden wird die entzündliche Antwort durch Inhibitoren pro-inflammatorischer Zytokine sowie das Ausschalten pro-inflammatorischer Gene negativ reguliert. Außerdem werden vermehrt anti-inflammatorische Botenstoffe ausgeschüttet.

Während des septischen Krankheitsverlaufes kann es jedoch zum Versagen dieser Regulation kommen, sodass eine Dysbalance zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Prozessen resultiert (Annane et al., 2005; Cohen, 2002; Hotchkiss und Karl, 2003). Durch eine massive Induktion der anti-inflammatorischen Anteile der Wirtsantwort kann ein sogenanntes *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS) entstehen. Die Ausmaße dieser anti-inflammatorischen Gegenregulation gehen

klinisch von einer Schwächung des Immunsystems bis hin zu einer Immunparalyse. Bei einem Fortbestand des bakteriellen Fokus, einer Superinfektion oder bei einer Reaktivierung einer persistenten Virusinfektion kann so das Überleben des Patienten entscheidend negativ beeinflusst werden (Adib-Conquy und Cavillon, 2009; Bone, 1996b; Hotchkiss und Karl, 2003).

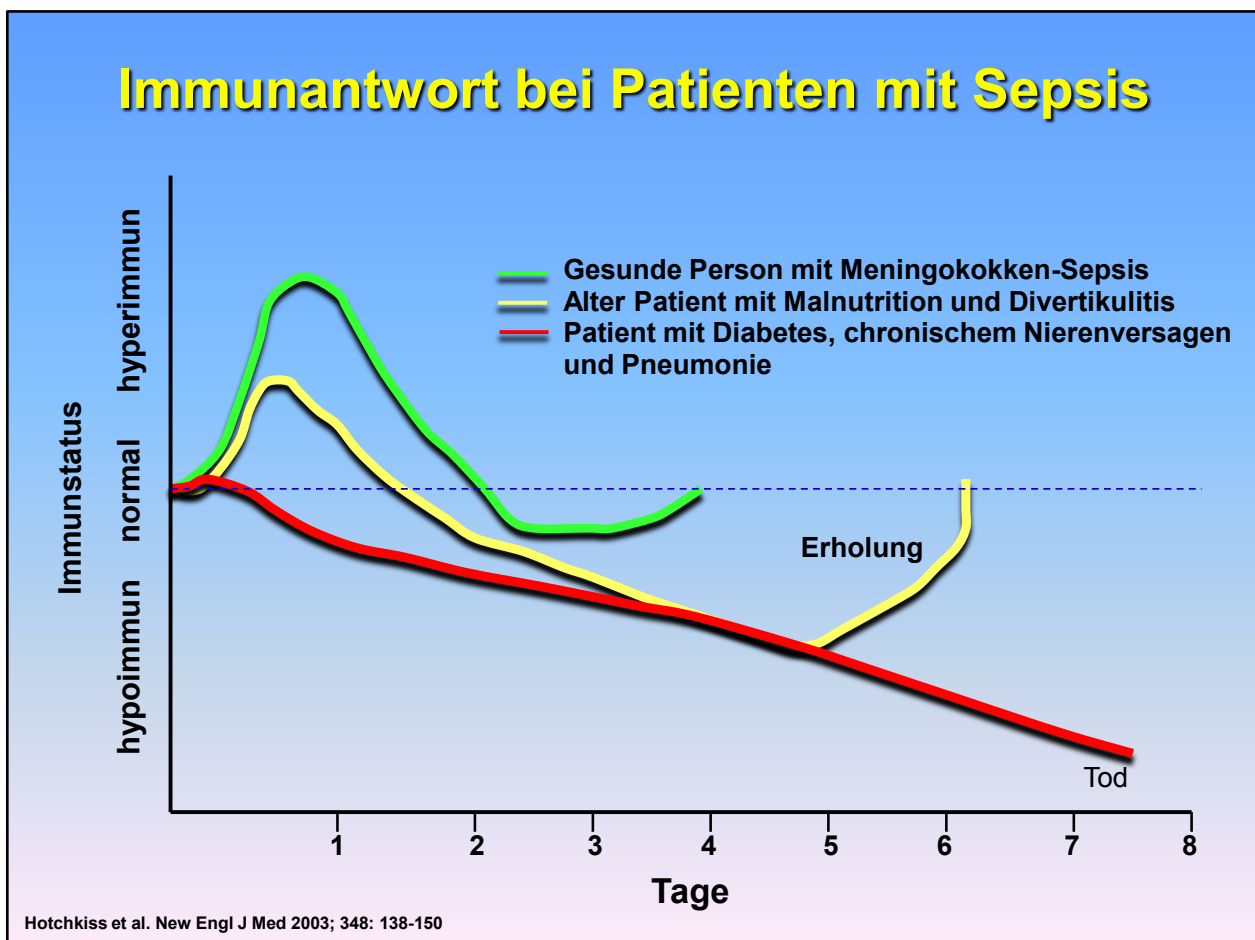


Abbildung 1: Mögliche Verläufe der Immunantwort bei einer Sepsis

Grün: Ein gesunder Patient mit neu aufgetretener Meningokokkeninfektion zeigt eine schnelle, pro-inflammatorische Reaktion, die im Verlauf anti-inflammatorisch gegenreguliert wird und nach kurzer Zeit in einer *restitutio ad integrum* endet.

Gelb: Alter Patient mit chronischer Grunderkrankung, weniger stark ausgeprägter pro-inflammatorischer Komponente und längerer Erholungsphase.

Rot: Multimorbider Hochrisikopatient mit insuffizienter pro-inflammatorischer Antwort. Eine Erholung kann nicht stattfinden und der Patient verstirbt in der Immunparalyse. Modifiziert nach Hotchkiss und Karl, 2003.

Bisher scheiterten nahezu alle klinischen Studien zu neuen, vielversprechenden Sepsis-Therapieansätzen (Bone, 1996a; Dhainaut et al., 1994; Fisher et al., 1994; Greenman et al., 1991; Ziegler et al., 1991). Hierfür scheint der interindividuell hochvariable und daher unvorhersehbare Ablauf eines septischen Geschehens verantwortlich zu sein. Je nachdem, ob sich das Immunsystem eines Patienten in einem aktivierten oder paralyisierten Zustand befindet, kann eine Unterstützung oder Dämpfung der Immunaktivität notwendig werden. Um die richtige Therapiestrategie wählen zu können, müsste eine genaue Bestimmung des derzeitigen Immunstatus des Patienten gelingen (Monneret et al., 2008).

Die Vergangenheit zeigte, dass die Unterstützung einer sowieso schon überschießenden inflammatorischen Reaktion oder aber die Dämpfung einer bereits abgeschwächten Immunaktivität deletäre Folgen für den Erkrankten haben kann (Bone, 1996a). In diesem Zusammenhang erscheint die Erforschung von Therapieansätzen, deren schützende Funktion unabhängig von dem derzeitigen Immunstatus des Patienten ist, als besonders erstrebenswert.

1.2.2 *Toll-like* Rezeptor-abhängige Signaltransduktion

Die 11 menschlichen TLR vermitteln als wesentliche Bestandteile des angeborenen Immunsystems eine schnelle Antwort auf einen potenziellen Schaden (*first line defense*). Hierzu binden sie hochspezifisch an PAMP oder an DAMP (Tab. 4). Sie sind entweder in die äußere Zellmembran integriert (TLR1, -2, -4, -5, -6) oder befinden sich auf Membranen von intrazellulären Vesikelstrukturen wie beispielsweise dem endoplasmatischen Retikulum. Alle TLR bestehen aus einer Liganden-bindenden Extrazellulär (EC)-Domäne, einer Transmembran (TM)-Domäne und einer intrazellulären Toll-interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne.

Für eine vollständige Funktionalität benötigen die meisten TLR komplexbildende Ko-rezeptoren. So ist die Bindung von LPS an die EC-Domäne von TLR4, wie bereits oben erwähnt, erst möglich, wenn sich gleichzeitig CD14, MD-2 und das LPB komplexieren (Kap. 1.2.1).

Nahezu alle TLR aktivieren die intrazelluläre Signaltransduktion über das an die TIR-Domäne gebundene Adaptermolekül *myeloid differentiation primary response gene* (MyD88). Am Ende der Signaltransduktion steht die Translokation von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise dem *nuclear factor- κ B* (NF κ B) in den Zellkern und dessen Aktivierung (Siebenlist et al., 1994). Dies führt schließlich zur veränderten Expression von inflammatorischen Zytokinen, Interferonen und Chemokinen und initiiert die Entzündungsantwort. In ähnlicher Weise führt auch die Signalvermittlung über *mitogen activated protein* (MAP) Kinasen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktoren *activator protein-1* (AP-1) und dadurch zu einer vermehrten Bildung von den oben bereits genannten inflammatorischen Mediatoren. TLR3, -4 und -9 können außerdem die Interferon-regulierenden Transkriptionsfaktoren *interferon regulator factor 3* (IRF3) und *interferon regulator factor 7* (IRF7) aktivieren.

Tabelle 3: Toll-like Rezeptoren (TLR) und ihre spezifischen Agonisten

TLR erkennen als Mustererkennungsrezeptoren sowohl *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) als auch *damage associated molecular patterns* (DAMP). Als PAMP bezeichnet man Bestandteile ubiquitär vorkommender, pathogener Strukturen aus Bakterien, Pilzen und Viren. Im Gegensatz dazu sind DAMP Wirts-eigene Komponenten, die durch eine Zellschädigung freigesetzt werden. Hier ein beispielhafter Auszug der Herkunft von PAMP und DAMP und ihrer jeweiligen TLR.

Toll-like Rezeptor	spezifischer PAMP/DAMP	Herkunft des PAMP/DAMP
TLR1	Lipopeptide / lösliche Faktoren	Bakterien und Mykobakterien Neisseria meningitidis
TLR2	Lipoproteine / Lipopeptide Peptidoglykan/ Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Zymosan	verschiedene Pathogene grampositive Bakterien Mykobakterien Pilze
TLR3	Doppelstrang-RNA	Viren
TLR4	Lipopolysaccharid Taxol Fusion Protein <i>High mobility group box-1 Protein</i> (HMGB-1)	gramnegative Bakterien Pflanzen RS-Virus Wirts-eigene Zellen
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Zymosan Lipoteichonsäure Diacyllipopeptide	Pilze grampositive Bakterien Mykoplasmen
TLR7	Einzelstrang-RNA	Viren
TLR8	Einzelstrang-RNA	Viren
TLR9	CpG-Sequenz-reiche DANN Mitochondriale DANN	Bakterien, Viren Wirts-eigene Zellen
TLR10	unbekannt	unbekannt
TLR11	unbekannt	Uropathogene Bakterien

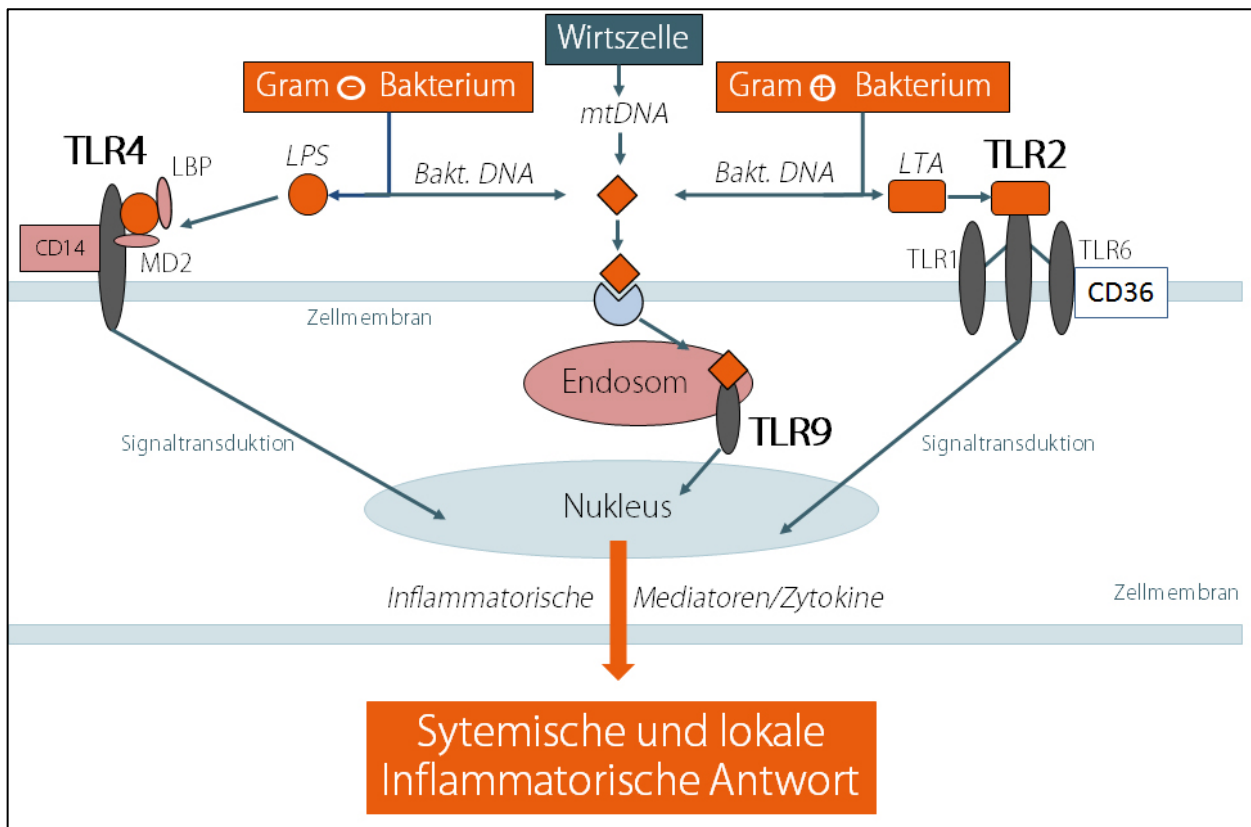


Abbildung 2: TLR-abhängige Signaltransduktion

Toll-like Rezeptoren (TLR) binden als Mustererkennungsrezeptoren Bestandteile ubiquitär vorkommender, pathogener Strukturen. Gelangt Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, in den menschlichen Organismus, so wird es mit Hilfe von 3 Korezeptoren, dem *LPS binding protein* (LBP), dem *cluster of differentiation* (CD) 14 und dem MD 2, von seinem eigentlichen Rezeptor, dem TLR4, gebunden. Analog hierzu bindet der TLR2 als Heterodimer mit TLR1 oder TLR6, nach Komplexbildung mit dem CD 36, Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien, namentlich Lipoteichonsäure (LTA) und Lipopeptide. Kommt es bei einem nekrotischen oder apoptotischen Zellzerfall zur Freisetzung Wirts-eigener mitochondrialer (mt) DNA, so wird diese, ebenso wie bakterielle DNA, nach Endozytose von dem intrazellulären TLR9 gebunden. In allen 3 Fällen erfolgt die Signaltransduktion in den Zellkern und konsekutiv die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Diese induzieren wiederum die Synthese und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, Interferonen und Chemokinen.

Es erfolgt also eine TLR-abhängige Induktion der pro-inflammatorischen Antwort mit einer zeitabhängigen Freisetzung von zahlreichen pro-inflammatorischen Mediatoren wie beispielsweise dem Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β und IL-6, Prostaglandinen, Leukotrienen, Chemokinen und dem Plättchenaktivierenden Faktor (Takeuchi und Akira, 2010). Bei einer ausgeprägten Amplifikation dieses Systems resultiert ein schwerer Krankheitsverlauf mit septischem Schock (Angus und van der Poll, 2013).

Die natürliche Kontrolle der induzierten pro-inflammatorischen Antwort erfolgt durch die gleichzeitig stattfindende Induktion eines inhibitorischen Regulationssystems. Neben der Hemmung der Signaltransduktionskaskade durch die *IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-M*, den *suppressor of cytokine signalling (SOCS)1*, das *single immunoglobulin IL-1-R-related molecule (SIGIRR)*, *MyD88 short* und *ST2* (Lang und Mansell, 2007) wurde auch die vermehrte Bildung von anti-inflammatorischen Mediatoren wie IL-10 (Iyer und Cheng, 2012) und der Hämooxygenase (HO) -1 (Lee und Chau, 2002; Paine et al., 2010) als wichtiger Regulationsmechanismus beschrieben. Eine Störung dieser Regelkreise kann, wie weiter oben bereits beschrieben, sowohl in einer Immunparalyse als auch in einer Hyperinflammation gipfeln (Osuchowski et al., 2006) (Abb. 1).

Die Rolle der HO-1 im Rahmen von organprotektiven Szenarien ist Gegenstand dieser Dissertation.

1.2.3 Endotoxintoleranz und Kreuztoleranz: Das *Two Hit*-Modell

Die Beobachtung, dass der zeitliche Ablauf und die Ausprägung der anti-inflammatorischen Antwort für den Verlauf der Erkrankung und das Überleben des Patienten mitentscheidend sind, könnte für neue Therapieoptionen wegweisend sein. Daten aus der Literatur lassen vermuten, dass die Vorbehandlung mit nicht-letalen Dosierungen von PAMP (*first hit*) den Organismus vor einer potenziell tödlichen Hyperinflammation aufgrund eines zweiten, nachgeschalteten PAMP/DAMP Stimulus (*second hit*) schützen kann (West und Heagy, 2002). Erste Versuche legen einen ähnlich protektiven Mechanismus auch für eine Vorbehandlung mit DAMP nahe (Fernandez-Ruiz et al., 2014).

Wird sowohl für den *first* als auch für den *second hit* LPS als PAMP verwendet, so wird das zu beobachtende Phänomen als LPS- oder auch Endotoxintoleranz (ET)

bezeichnet. Zunächst beobachtete man hierbei *in vitro* und *in vivo* eine, durch Vorbehandlung mit LPS herbeigeführte, verminderte Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (van der Poll et al., 1996). Mittlerweile wird immer deutlicher, dass die Entstehung einer Endotoxintoleranz wahrscheinlich aus einem Zusammenspiel unterschiedlichster Mechanismen entsteht (Biswas und Lopez-Collazo, 2009).

Die organprotektive Wirkung einer Endotoxintoleranz konnte bereits für zahlreiche Organe wie Leber (Dominguez Fernandez et al., 2002; Flohe et al., 1999; Topp et al., 2008), Niere (Heemann et al., 2000), Herz (Meng et al., 1996; Zacharowski et al., 1999), Gehirn (Chen et al., 2005) und Lunge (Chen et al., 2005; Flohe et al., 1991; Koch et al., 2007; Qu et al., 2003) gezeigt werden.

Interessanterweise lassen sich ähnliche Abläufe auch für andere PAMP beobachten: Injiziert man nach einer LPS-Vorbehandlung statt einer letalen Dosis Endotoxin Bestandteile grampositiver Bakterien, zum Beispiel LTA und PepG, so zeigt sich in Analogie zur Endotoxintoleranz erneut eine abgemilderte Immunreaktion. In diesem Fall schützt die Präkonditionierung mit LPS jedoch vor einem grampositiven Insult. Dieses Phänomen wird aufgrund der differenten Stimuli als Kreuztoleranz (KT) bezeichnet. Der Nachweis einer Kreuztoleranz impliziert, dass die LPS-induzierte Toleranzentwicklung nicht allein durch eine Herabregulation oder Desensibilisierung von dem TLR4 zu erklären ist, da der *second hit* über andere Rezeptoren, nämlich zum einen von einem Heterodimer aus TLR2 und TLR6 oder TLR1 (LTA) und zum anderen über die NOD1 und -2 Rezeptoren (PepG) vermittelt wird.

Ein genaues Verständnis der zugrunde liegenden Wirkmechanismen von Endotoxin- und Kreuztoleranz könnte einen elementaren Beitrag dazu liefern, in Zukunft das inflammatorische Geschehen adäquat modulieren zu können und somit die Therapie von Sepsis und Organversagen zu optimieren.

1.2.4 Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)

Im Hinblick auf die Pathogenese von Sepsis und Lungenversagen hat das körpereigene, zweiatomige, hochreaktive Gas Stickstoffmonoxid (NO) einen besonderen Stellenwert (Dweik, 2005; Gross et al., 1996; Thiemermann, 1997; Wizemann et al., 1994).

Bereits seit Ende der 80er Jahre ist bekannt, dass sowohl Zellen der Immunabwehr als auch Parenchymzellen in Folge eines inflammatorischen Stimulus große Mengen NO freisetzen (Marletta et al., 1988; Palmer et al., 1987). Hierbei führt die durch DAMP- oder PAMP-Kontakt aktivierte Signalkaskade unter anderem zu einer TLR-vermittelten, NFκB-abhängigen Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS). Im Vergleich zu der konstitutiv exprimierten, endothelialen (e)NOS und der neuronalen (n)NOS stellt die iNOS die am stärksten induzierbare Isoform der drei NO Synthasen (NOS) dar. Nach Aktivierung kann sie die körpereigene Syntheseleistung von NO, im Vergleich zu der eNOS und nNOS, um das 1000-fache steigern (Knowles und Moncada, 1994; Nathan und Xie, 1994). In dieser hohen Konzentration wirkt NO zytotoxisch und dient PMN somit zur Vernichtung eingedrungener Pathogene (Bogdan, 2001; Chan et al., 1992). Die NOS katalysieren mit Hilfe von O₂ und Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) aus L-Arginin die Entstehung von NO und L-Citrullin.

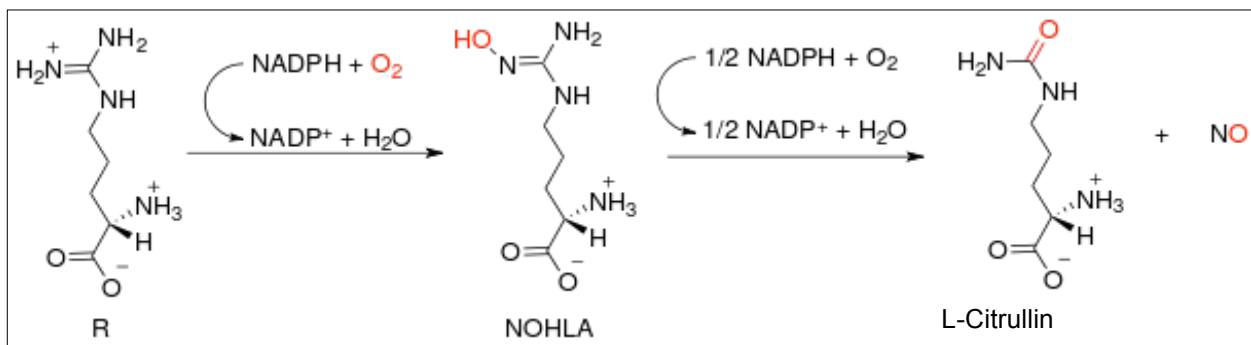


Abbildung 3: Stickstoffmonoxid-Synthese

Chemische Reaktion der Stickstoffmonoxid (NO)-Bildung durch die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS). Unter Verbrauch von NADPH und O₂ entstehen aus L-Arginin Stickstoffmonoxid und L-Citrullin. Es handelt sich hierbei um die 5-Elektronen-Oxidation eines der Guanidino-Stickstoffatome von L-Arginin. Sie läuft in zwei Schritten über das Intermediat N^ω-hydroxy-L-Arginin (NOHLA) ab. Modifiziert nach Knowles und Moncada, 1994.

Das gebildete NO ist hochreaktiv und für zahlreiche inflammatorische Abwehr- und Regulationsprozesse unabdingbar. Eine NO abhängige Vasodilatation führt beispielsweise zu einer Verlangsamung des Blutstromes und begünstigt auf diesem Weg den Austritt von Immunzellen aus dem Gefäßbett an den Ort einer lokalen Entzündung (Ley et al., 2007). Weiterhin können RNS, wie bereits in Kapitel 1.1.3 erwähnt, effizient Pathogene zerstören. So wird beispielsweise Nitrit in Immunzellen über eine Redoxreaktion in das zytotoxische Peroxynitrit umgewandelt (Szabo et al., 2007). Wenn es im Rahmen einer systemischen Inflammation zur exzessiven Freisetzung von NO kommt, kann sich dieses destruktive Potential auch gegen Wirts-eigene Zellen richten (MacMicking et al., 1997). Dann führt eine ungebremste, systemische Vasodilatation zu einer Vasoplegie (Thiemermann, 1997) und der übermäßige Anfall von RNS zu einem nekrotischen Zellzerfall (Brown und Borutaite, 2002; Szabo et al., 2007). Dieser Untergang Wirts-eigener Zellen scheint unter anderem durch eine überschießende NO-induzierte Hemmung der mitochondrialen Atmungskette mit einer konsekutiven Eröffnung der *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) bedingt zu sein. Die dadurch entstehende Permeabilitätssteigerung führt situationsabhängig zu einem nekrotischen oder apoptotischen Zellzerfall (Brookes et al., 2000). Hierbei kommt es zu einer Liberation von intrazellulären Bestandteilen wie beispielsweise dem *high mobility group box 1* (HMGB1) Protein (Scaffidi et al., 2002). Diese Wirts-eigenen Zellfragmente können ihrerseits abermals als potente Immunstimulanzen wirken (Kono und Rock, 2008).

Trotz dieser negativen Aspekte einer iNOS-abhängigen NO-Produktion deuten sowohl Versuche mit iNOS-Inhibitoren (Pastor et al., 1994; Tiao et al., 1994) als auch Experimente an iNOS-Knockout-Mäusen (Cobb et al., 1999; MacMicking et al., 1997; Nicholson et al., 1999) darauf hin, dass eine fehlende oder inhibierte iNOS-Funktion mit einem schlechteren Überleben während inflammatorischer Prozesse assoziiert sein kann. Im klinischen Kontext führte die Gabe eines iNOS-Inhibitors während eines septischen Schockes sogar zu einer gesteigerten Mortalität (Lopez et al., 2004). Auch die Entstehung einer Endotoxintoleranz scheint von einer intakten iNOS-Funktion abhängig zu sein (Dias et al., 2005; Fahmi et al., 1995; Koch et al., 2007; Soszynski, 2002; Zingarelli et al., 1995).

Dweik et al. (2005) begründeten diese gegensätzlichen Beobachtungen damit, dass NO nicht nur als Radikal, sondern situations- und lokalisationsbedingt auch als potenzieller Radikalfänger fungieren kann. Fallen im Rahmen eines ARDS vermehrt hochtoxische Superoxid-Radikale ($O_2^{\cdot-}$) an, so verringert NO durch Superoxid-abhängige Bildung des im Vergleich dazu weniger schädlichen Peroxinitrits ($ONOO^{\cdot-}$) den entstehenden Zellschaden.

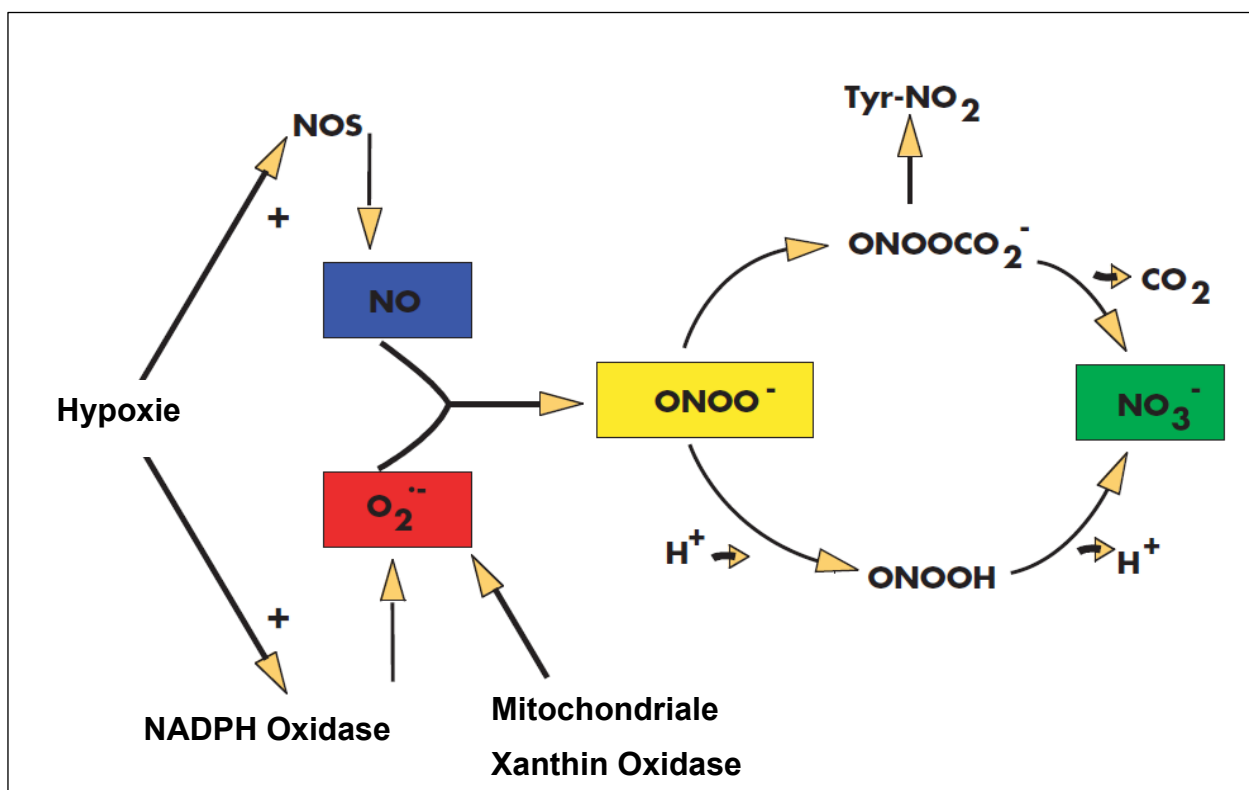


Abbildung 4: Vereinfachtes Modell der Reaktion von NO und Superoxid

Das körpereigene, hochreaktive Gas Stickstoffmonoxid (NO) scheint orts- und situationsabhängig nicht nur als Radikal, sondern auch als potenzieller Radikalfänger fungieren zu können. Fallen beispielsweise im Rahmen eines ARDS vermehrt hochtoxische Superoxid-Radikale ($O_2^{\cdot-}$) an, so verringert NO durch Bildung des im Vergleich dazu weniger schädlichen Peroxinitrits ($ONOO^{\cdot-}$) den entstehenden Zellschaden. Modifiziert nach Dweik et al., 2005.

Folglich scheint NO zeit-, orts- und dosisabhängig protektive und destruierende Eigenschaften zu besitzen. In diesem Zusammenhang ist die hier vorgelegte Arbeit der Frage nachgegangen, ob eine im Rahmen einer Toleranzentwicklung beobachtete Protektion NO-abhängig ist. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eventuell schützende Mechanismen direkt von NO ausgeübt werden oder ob eine NO Liberation erst die Synthese von protektiven Mediatoren induziert.

Ein möglicher Vermittler dieses NO-abhängigen Zellschutzes könnte die Hämoxigenase (HO)-1 sein. So ist bereits mehrfach gezeigt worden, dass die Induktion der iNOS mit einer deutlich gesteigerten Expression der HO-1 assoziiert ist (Camhi et al., 1995; Chen und Maines, 2000; Hartsfield et al., 1997; Motterlini et al., 1996; Srisook und Cha, 2004). Die Hypothese, dass eine Regulation der iNOS und konsekutiv der HO-1 auch im Rahmen einer pulmonalen Endotoxin- und Kreuztoleranz stattfindet, ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.2.5 Hämoxigenase (HO)-1

Die HO-1 wurde 1968 erstmals beschrieben (Tenhunen et al., 1968). Klassischerweise war für das 32 kD schwere Molekül lediglich seine Rolle im Häm-Abbau bekannt. Erst in den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass die HO-1 weitere, für die angeborene Immunität wichtige Eigenschaften besitzt: Häm, das Substrat der HO-1, ist selbst ein potenter, intrazellulärer Katalysator der Produktion von freien Radikalen. Seine Degradation durch die HO-1 mildert diesen potenziell zellschädigenden Effekt ab (Balla et al., 1991). Als Abbauprodukte des Häm entstehen in äquimolaren Dosen Kohlenmonoxid (CO), Biliverdin und Eisen (Abb. 5). Hierbei wird Biliverdin rasch zu Bilirubin umgewandelt und das Eisen wird in ebenfalls schneller Folge zu Ferritin abgebaut (Tenhunen et al., 1969). Sowohl Bilirubin (Wang et al., 2004) als auch CO (Tsoyi et al., 2009a) scheinen einen negativen Rückkopplungsmechanismus im Sinne einer iNOS-Inhibition zu haben.

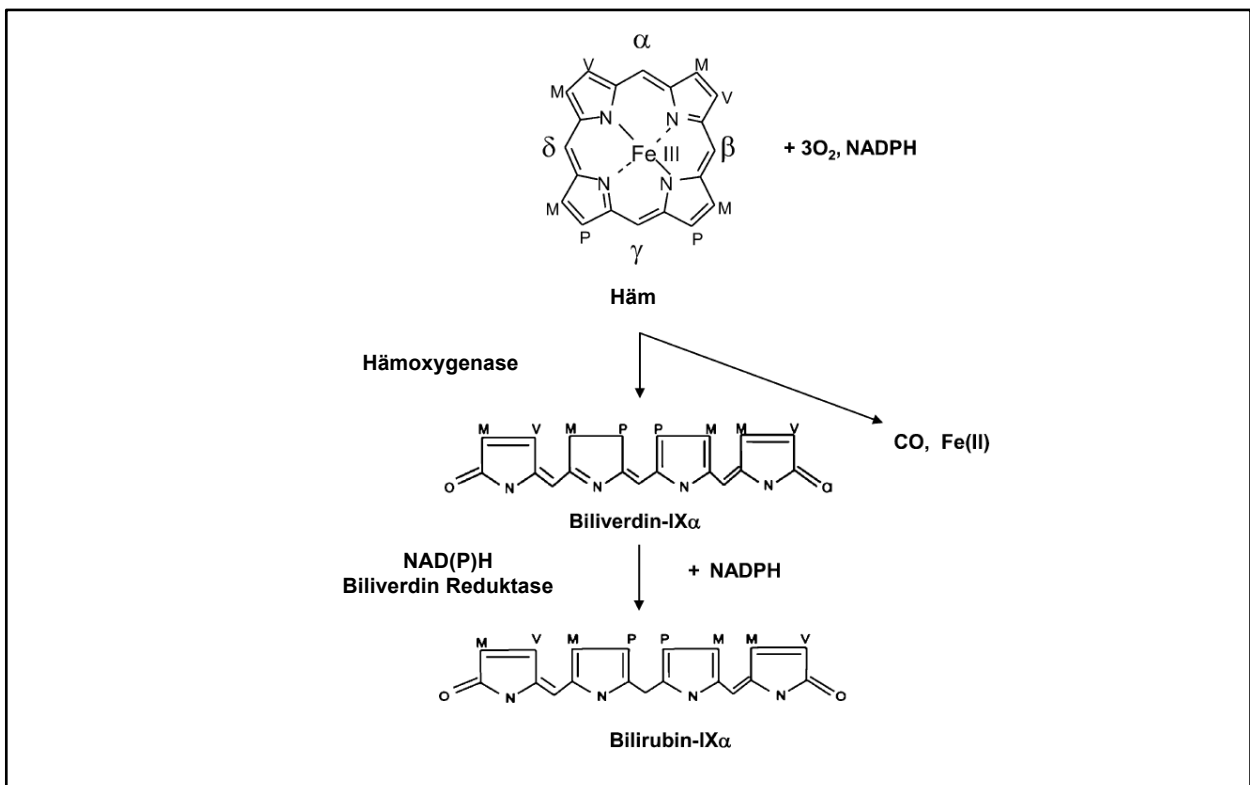


Abbildung 5: Hämabbau durch die HO-1

Die Hämoxigenase (HO)-1 katalysiert die oxidative Degradation von Häm zu Kohlenstoffmonoxid (CO), Eisen (Fe(II)) und Biliverdin. Modifiziert nach Ryter und Choi, 2009.

Als direkter Metabolit der HO-1-Reaktion verbleibt lediglich CO. Dieses stabile und hochmobile Molekül übt eine Vielzahl von Effekten auf Zellsignalwege aus. So kann CO im Rahmen von Erkrankungen wie einer Sepsis, einem ARDS, einer COPD oder einem Asthma, die durch ROS induzierten Signalkaskaden günstig beeinflussen (Knauer et al., 2013).

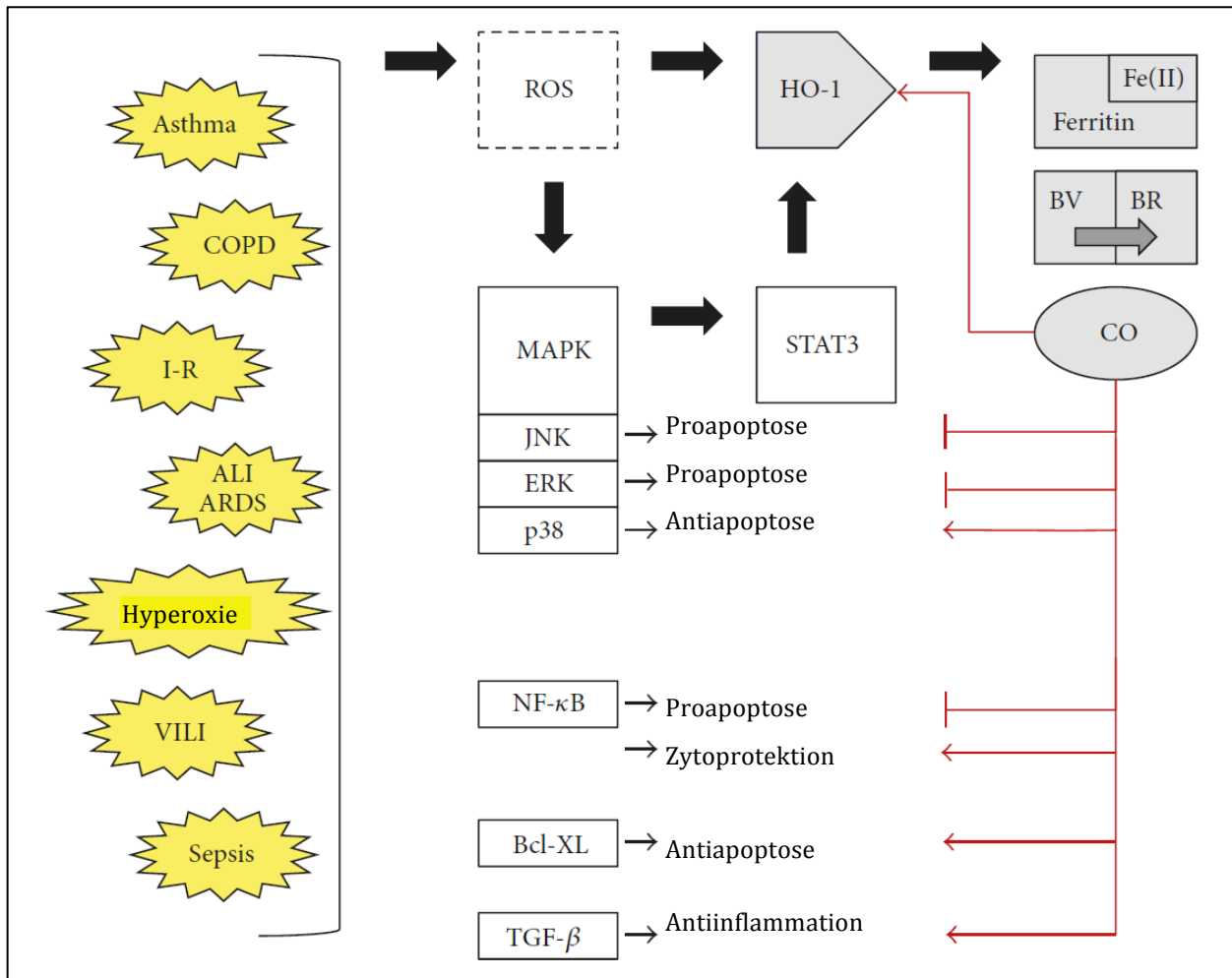


Abbildung 6: Induktoren von oxidativem Stress und HO-1-assoziierte Antworten

Eine Vielzahl von Erkrankungen oder unphysiologischen Zuständen führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese induzieren unter anderem über die hier dargestellte Signalvermittlung durch *mitogen activated protein* (MAP) Kinasen einen proinflammatorischen Gesamtzustand. Neben Eisen (Fe II) und Biliverdin (BV)/ Bilirubin (BR) wird auch Kohlenstoffmonoxid (CO) im Hämoxigenase (HO)-1-abhängigen Hämabbau freigesetzt. CO inhibiert eine Vielzahl von pro-apoptotischen Signalwegen und induziert anti-inflammatorische und anti-apoptotische Reaktionen. Neben der Aufgabe im Hämabbau scheint die HO-1 somit auch bedeutende, immunregulierende Funktionen zu besitzen. Diese werden unter anderem über die *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)3-vermittelte Signalkaskade induziert. Modifiziert nach Knauert et al., 2013.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle der iNOS und der HO-1 in Modellen der pulmonalen Endotoxintoleranz (ET) und Kreuztoleranz (KT).

Im Einzelnen wurde hierbei folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- 1) Lassen sich ein Modell der ET (LPS → LPS) und ein Modell der KT (LPS → LTA und PepG) *in vivo* in der Ratte etablieren? Folgende Untersuchungen wurden hierfür im Tiermodell durchgeführt:
 - Mittlerer arterieller Blutdruck: Stimations-Gruppen vs. Toleranz-Gruppen
 - Sterblichkeit: Stimations-Gruppen vs. Toleranz-Gruppen

- 2) Führt die Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS zu einem verringerten Lungenschaden im etablierten Modell von ET und KT und ist dies mit einer vermehrten HO-1-Proteinexpression assoziiert? Folgende Untersuchungen wurden hierfür an den entnommenen Rattenlungen durchgeführt:
 - *Wet-to-dry ratio*: Stimations-Gruppen vs. Toleranz-Gruppen
 - MPO-Aktivitätsassay: Stimations-Gruppen vs. Toleranz-Gruppen
 - *Western Blot* für die HO-1-Proteinmenge: Kontrolle vs. Toleranz-Gruppen

- 3) Ist die Induktion der iNOS mit einem erhöhten NO-Spiegel im Blut assoziiert und ist der selektive iNOS-Inhibitor 1400W auch in dem hier etablierten Modell funktionell? Folgende Untersuchungen wurden hierfür im Blutplasma der Ratten durchgeführt:
 - *Griess Assay*: NaCl-Vorbehandlung vs. LPS-Vorbehandlung
LPS-Vorbehandlung vs. LPS/1400W-Vorbehandlung

- 4) Verhindert die spezifische Inhibition der iNOS und der HO-1 die Ausbildung einer ET und verhindert die gezielte Inhibition von iNOS die Ausbildung einer KT? Folgende Untersuchungen wurden hierfür an den entnommenen Rattenlungen durchgeführt:
 - *Wet-to-dry ratio*: Toleranz-Gruppen vs. Inhibitor-Gruppen
 - MPO-Aktivitätsassay: Toleranz-Gruppen vs. Inhibitor-Gruppen
 - *Western Blot* für die HO-1: Toleranz-Gruppen vs. Inhibitor-Gruppen

2. Material und Methoden

2.1 Zeitlicher Ablauf der Versuchsreihe

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde bereits die Reinheit der verwendeten PAMP überprüft.

Zu Beginn der Versuchsreihe erfolgte die Bestätigung einer effizienten iNOS-Inhibition durch den iNOS-Inhibitor 1400W. Hierzu erhielten Wistar Ratten entweder NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.), LPS (1 mg/kg i.p.) oder LPS (1 mg/kg i.p.) und 1400W (5 mg/kg i.p.). Zum Zeitpunkt der höchsten iNOS-Expression (8 bzw. 16 Stunden nach Vorbehandlung) wurde den Tieren Blut entnommen und anhand des Griess Assays untersucht.

Zur Ermittlung der Kreislaufparameter und der Sterblichkeit während einer Endotoxin- und Kreuztoleranz wurden die Ratten entweder mit NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.) oder mit einer nicht-letalen Menge LPS (1 mg/kg i.p.) vorbehandelt. 24 Stunden später erfolgte eine hochdosierte, gramnegative (LPS 6 mg/kg i.v.; Endotoxintoleranz, Abb. 7) oder grampositive (LTA 3 mg/kg i.v., PepG 10 mg/kg i.v.; Kreuztoleranz, Abb. 8) Stimulation. Während der folgenden 6 Stunden wurde der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) der Tiere aufgezeichnet. Als Kontrolle diente hier eine sogenannte *Sham*-Gruppe. Diese Tiere erhielten als Vorbehandlungs- und als Stimulationsersatz jeweils NaCl 0,9 % Injektionen (1 ml/kg i.p. / 6 ml/kg i.p.).

Für die Untersuchung der Lungenprotektion wurden die Ratten ebenfalls entweder mit NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.) oder mit einer nicht-letalen Menge LPS (1 mg/kg i.p.) präkonditioniert. Auch hier erfolgte 24 Stunden später eine hochdosierte, gramnegative (LPS 6 mg/kg i.v.; Endotoxintoleranz, Abb. 7) oder grampositive Stimulation (LTA 3 mg/kg i.v., PepG 10 mg/kg i.v.; Kreuztoleranz, Abb. 8). Anschließend wurde die pulmonale Inflammation sowie die HO-1-Expression der Rattenlungen nach weiteren 6 Stunden gemessen. Als Kontrolle dienten hierbei Tiere der Kontroll-Gruppe. Sie erhielten keinerlei Intervention.

Zur Klärung des postulierten kausal-induktiven Zusammenhanges LPS → iNOS → NO → HO-1 wurde jeweils einer weiteren Gruppe im Rahmen der Vorbehandlung zusätzlich zu LPS der hochspezifische iNOS-Inhibitor 1400W (5 mg/kg i.p.) appliziert. Eine letzte Gruppe erhielt schließlich in den Endotoxintoleranz-Versuchen 18 Stunden nach LPS-Vorbehandlung zusätzlich den HO-1-Inhibitor Zink Protoporphyrin IX (SnPPIX, 50 µmol/kg i.p.).

Die gewählten Zeitfenster basierten hierbei auf der aktuellen Literatur und vorangegangenen Ergebnissen der Arbeitsgruppe. Diese hatten in der Lunge nach Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS eine maximale iNOS-Expression nach 8 und 16 Stunden und eine maximale HO-1-Expression nach 24 Stunden gezeigt (Koch et al., 2007).

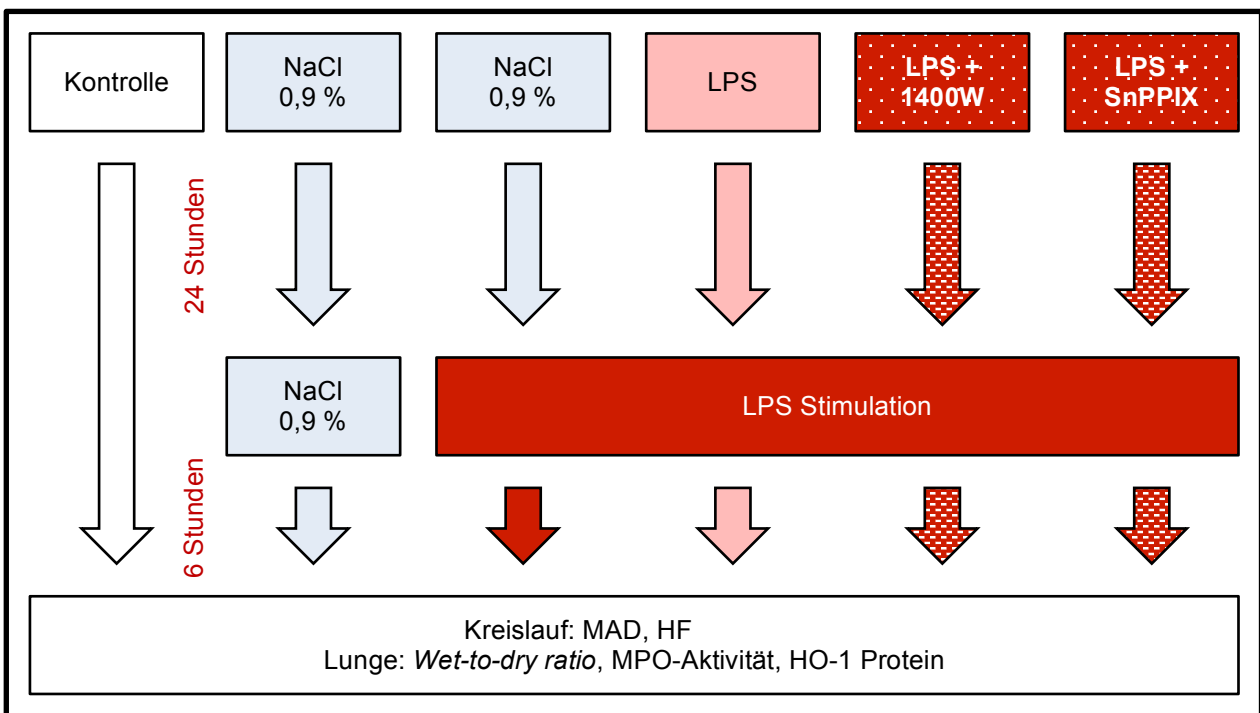


Abbildung 7: Zeitverlauf des Modells der Endotoxintoleranz

Nach intraperitonealer Verabreichung der jeweiligen Vorbehandlung verblieben die Ratten für weitere 24 Stunden in ihrer bekannten Umgebung und hatten unverändert Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Je nach Versuchsprotokoll erfolgte 24 Stunden später die Applikation von Lipopolysaccharid (LPS) oder NaCl 0,9 %. Während der kommenden 6 Stunden wurden die Versuchstiere unter Anästhesiebedingungen überwacht. Danach wurden die überlebenden Ratten durch eine Überdosis Thiopental getötet. Bei Tieren, die zur Lungenentnahme vorgesehen waren, erfolgte die umgehende, beidseitige, totale Pneumektomie. Kontroll-Tiere erhielten keinerlei Intervention.

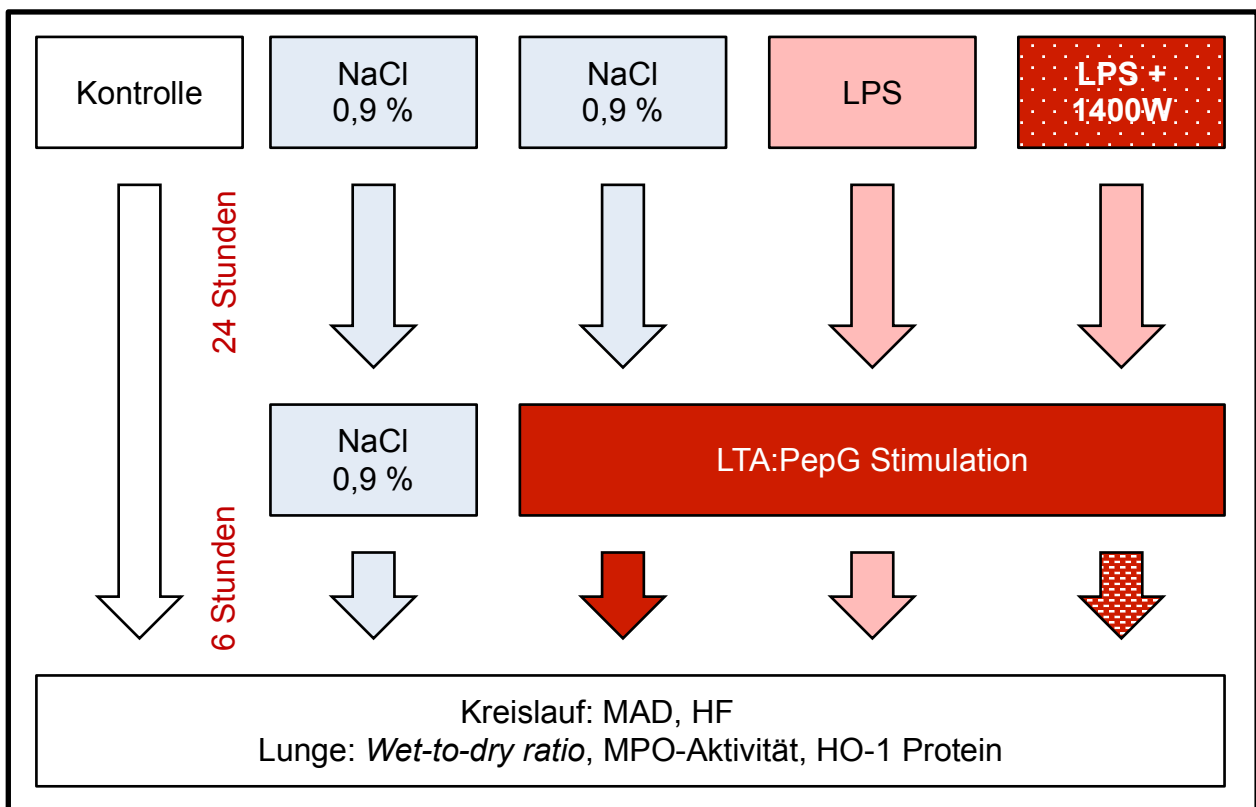


Abbildung 8: Zeitverlauf des Modells der Kreuztoleranz

Nach Präkonditionierung durch intraperitoneale Applikation der jeweiligen Vorbehandlung verblieben die Ratten für weitere 24 Stunden in ihrer bekannten Umgebung und hatten unverändert Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Je nach Versuchsprotokoll wurde 24 Stunden später Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykan (PepG) oder NaCl 0,9 % appliziert. In den folgenden 6 Stunden wurden die Tiere unter Anästhesiebedingungen überwacht. Danach wurden die überlebenden Ratten durch eine Überdosis Thiopental getötet. Bei Tieren, die zur Lungenentnahme vorgesehen waren, folgte die umgehende, beidseitige, totale Pneumektomie. Kontroll-Tiere erhielten keinerlei Intervention.

2.2 Versuchstiere

Zur Durchführung der Tierversuche wurden männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht zwischen 220 und 300 Gramm gewählt. Die in der Tierversuchsanstalt Düsseldorf gezüchteten Tiere erhielten eine standardisierte Ernährung und Wasser *ad libitum*. Sämtliche Experimente wurden von den Tierschutzbehörden genehmigt und nach Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (TVA Nummer 50.05-230-8/03).

2.3 Verifizierung der Reinheit der verwendeten PAMP

2.3.1 Reinheit von LPS

Zum Ausschluss einer möglicherweise vorliegenden TLR2-agonistischen Wirkung wurde ein *in vitro* assay an TLR4- bzw. TLR2-transfizierten HEK (*human embryonic kidney*) 293-CD14 Zellen vor Beginn dieser Versuchsreihe angefertigt. Hierzu wurde eine transiente Infektion der Zellen mit TLR2 oder TLR4 durchgeführt. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte die Inkubation der Zellen mit kommerziellen LPS Präparationen (0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml) oder mit NaCl 0,9 %. Die Messungen wurden wie unter Zacharowski et al., (2006) durchgeführt. Die Luciferase- und Galaktosidase-Aktivitäten wurden qualitativ mittels eines Chemilumineszenz assays bestimmt und das entsprechende Verhältnis zwischen Luciferase- und Galaktosidase-Aktivität ermittelt. Die Versuchsdurchführung erfolgte hierbei in Triplets. Nach Inkubation mit dem zu überprüfenden LPS zeigten lediglich die TLR4-transfizierten Zellen eine signifikant gesteigerte Luciferase-Aktivität, sodass von der Verwendung eines TLR2-Agonist-freien LPS ausgegangen werden kann.

2.3.2 Reinheit von LTA und PepG

Zellwandfragmente von vegetativen *Staphylococcus aureus* Zellen wurden, wie bereits von Foster (1992) beschrieben, präpariert.

PepG Extrakt wurde elektrophoretisch in einem *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide* (SDS) Gel getrennt. Hierbei gab es keine Hinweise auf eine Verunreinigung mit Proteinen. Weiterhin erfolgte eine enzymatische Verdauung von PepG. Wie erwartet zeigte diese in der Flüssigkeitschromatografie ein reines Muropeptid-Profil.

Die LTA Präparation wurde analog zu Lehner et al. (2001) und Morath et al. (2002) in einem *Limulus Amebocyte Assay* auf Freiheit von LPS geprüft. Auch hier fanden sich keine Verunreinigungen.

2.4 Tierversuche zur iNOS-Funktion und -Inhibition

Zur Überprüfung der effektiven iNOS-Inhibition durch 1400W wurden die Versuchstiere je nach Gruppenzugehörigkeit entweder mit NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.), LPS (1 mg/kg i.p.) oder LPS (1 mg/kg i.p.) und 1400W (5 mg/kg i.p.) vorbehandelt. Danach blieben die Tiere bis zu den jeweiligen Tötungszeitpunkten (8 bzw. 16 Stunden) in ihrem gewohnten Umfeld und hatten Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Nach intraperitonealer Verabreichung von 100 mg/kg Thiopental wurde die Aorta mit einer heparinbeschichteten Spritze punktiert und Blut zur Nitritbestimmung entnommen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4 °Celsius wurde das erhaltene Plasma schließlich bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °Celsius gelagert.

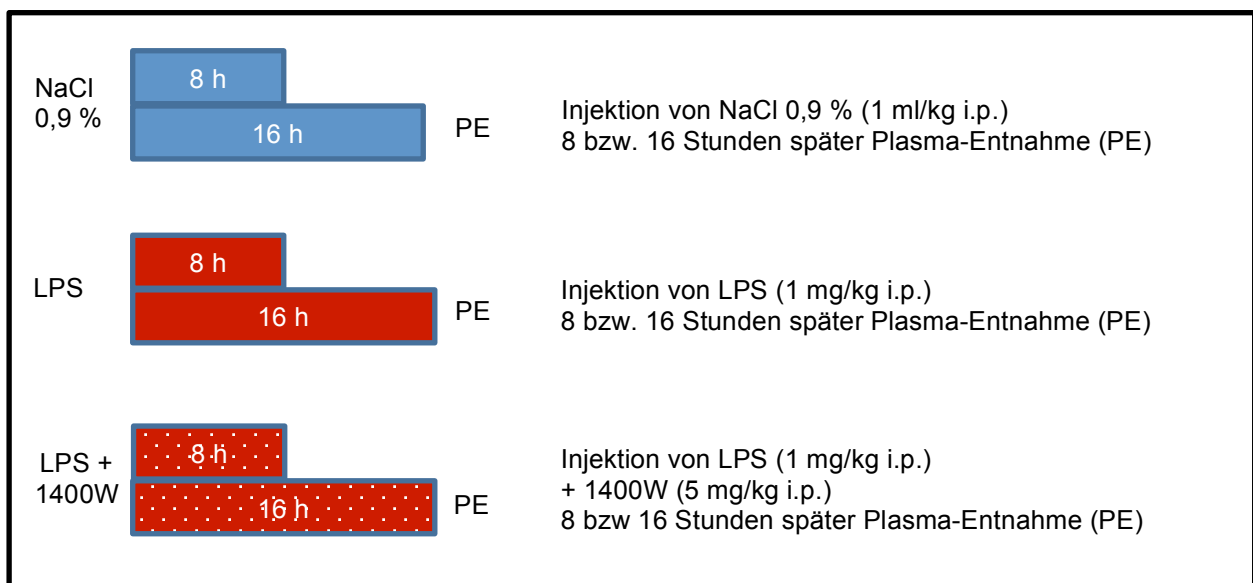


Abbildung 9: Tierversuche zur iNOS-Funktion und -Inhibition. Aufgrund der für die Aussagekraft dieser Versuchsreihe großen Wichtigkeit einer effektiven iNOS-Inhibition, wurde die Wirksamkeit des verwendeten 1400W speziell für den hier verwendeten Versuchsaufbau untersucht. Zum Zeitpunkt der höchsten pulmonalen iNOS-Expression (8 und 16 Stunden nach jeweiliger Vorbehandlung, s.o.) erfolgte hierzu die Entnahme von Blutplasma durch Aortenpunktion. Zuvor waren die Ratten bis zu dem jeweiligen Tötungszeitpunkt in ihrer bekannten Umgebung geblieben und hatten unverändert Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*.

2.5 Tierversuche zur Endotoxin- und Kreuztoleranz

2.5.1 Tierversuche zur Sterblichkeit

Zur Durchführung dieser Versuchsreihe wurden die Versuchstiere in 5 Versuchsgruppen (n = 6) randomisiert:

NaCl → NaCl Gruppe (*Sham*): Injektion von NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.); Injektion von NaCl (1 ml/kg i.v.) nach 24 Stunden; Aufzeichnung der Vitalparameter für 6 Stunden

NaCl → LPS Gruppe: Injektion von NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.); Injektion von LPS (6 mg/kg i.v.) nach 24 Stunden; Aufzeichnung der Vitalparameter für 6 Stunden

LPS → LPS Gruppe: Injektion von LPS (1 mg/kg i.p.); Injektion von LPS (6 mg/kg i.v.) nach 24 Stunden; Aufzeichnung der Vitalparameter für 6 Stunden

NaCl → LTA+PepG Gruppe: Injektion von NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.); Injektion von LTA (3 mg/kg i.v.) und PepG (10 mg/kg i.v.) nach 24 Stunden; Aufzeichnung der Vitalparameter für 6 Stunden

LPS → LTA+PepG Gruppe: Injektion von LPS (1 mg/kg i.p.); Injektion von LTA (3 mg/kg i.v.) und PepG (10 mg/kg i.v.) nach 24 Stunden; Aufzeichnung der Vitalparameter für 6 Stunden

Durchführung der Tierversuche zur Sterblichkeit:

Nach intraperitonealer Verabreichung der jeweiligen Vorbehandlung verblieben die Ratten für weitere 24 Stunden in ihrer bekannten Umgebung und hatten unverändert Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*.

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch intraperitoneal verabreichtes Thiopental (100 mg/kg) und wurde bei Bedarf mit Nachinjektionen aufrechterhalten. Anschließend wurden die Tiere zur Sicherung der Atemwege tracheotomiert. Je nach Versuchsprotokoll erfolgte die Applikation von LPS (6 mg/kg i.v.) oder LTA (3 mg/kg i.v.) und PepG (10 mg/kg i.v.) über einen in die V. jugularis interna eingebrachten zentralen Venenkatheter (ZVK). Außerdem diente dieser Zugang der stündlichen Applikation einer Volumensubstitution von 1 ml/kg NaCl 0,9 %. Der arterielle Mitteldruck (MAD) der Versuchstiere wurde mit Hilfe eines an die ebenfalls kanülierte Arteria carotis angeschlossenen Druckwandlers kontrolliert und für 6 Stunden aufgezeichnet. Die rektal gemessene Körperkerntemperatur der Tiere wurde bedarfsadaptiert mit Wärmematten

konstant gehalten (Abb. 10). Die Tötung der überlebenden Tiere erfolgte durch eine Überdosis Thiopental.

2.5.2 Tierversuche zur Lungenprotektion

In dieser Versuchsreihe erfolgte die Randomisierung der Versuchstiere nun in 8 Versuchsgruppen (n = 6):

Kontroll-Gruppe: Diese Tiere erhielten keinerlei Intervention

NaCl → LPS Gruppe: Injektion von NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.); Injektion von LPS (6 mg/kg i.v.) nach 24 Stunden; Organentnahme nach weiteren 6 Stunden (Σ 30 Stunden nach Vorbehandlung)

LPS → LPS Gruppe: Injektion von LPS (1 mg/kg i.p.); Injektion von LPS (6 mg/kg i.v.) nach 24 Stunden; Organentnahme nach weiteren 6 Stunden (Σ 30 Stunden nach Vorbehandlung)

LPS+1400W → LPS Gruppe: Injektion von LPS (1 mg/kg i.p.) + 1400W (5 mg/kg i.p.); Injektion von LPS (6 mg/kg i.v.) nach 24 Stunden; Organentnahme nach weiteren 6 Stunden (Σ 30 Stunden nach Vorbehandlung)

LPS+SnPPIX → LPS Gruppe: Injektion von LPS (1 mg/kg i.p.) , Injektion von SnPPIX (50 µmol/kg i.p.) nach 18 Stunden; Injektion von LPS (6 mg/kg i.v.) nach 24 Stunden; Organentnahme nach weiteren 6 Stunden (Σ 30 Stunden nach Vorbehandlung)

NaCl → LTA+PepG Gruppe: Injektion von NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.); Injektion von LTA (3 mg/kg i.v.) und PepG (10 mg/kg i.v.) nach 24 Stunden; Organentnahme nach weiteren 6 Stunden (Σ 30 Stunden nach Vorbehandlung)

LPS → LTA+PepG Gruppe: Injektion von LPS (1 mg/kg i.p.); Injektion von LTA (3 mg/kg i.v.) und PepG (10 mg/kg i.v.) nach 24 Stunden; Organentnahme nach weiteren 6 Stunden (Σ 30 Stunden nach Vorbehandlung)

LPS+1400W → LTA+PepG Gruppe: Injektion von LPS (1 mg/kg i.p.) + 1400W (5 mg/kg i.p.); Injektion von LTA (3 mg/kg i.v.) und PepG (10mg/kg i.v.) nach 24 Stunden; Organentnahme nach weiteren 6 Stunden (Σ 30 Stunden nach Vorbehandlung)

Durchführung der Tierversuche zur Lungenprotektion:

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu 2.5.1. In dieser Versuchsreihe wurde der MAD ggf. durch zusätzliche Volumensubstitution korrigiert. 6 Stunden nach Stimulation erfolgte die Tötung der Tiere durch Injektion einer Überdosis Thiopental. Die entnommenen Lungen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °Celsius gelagert.

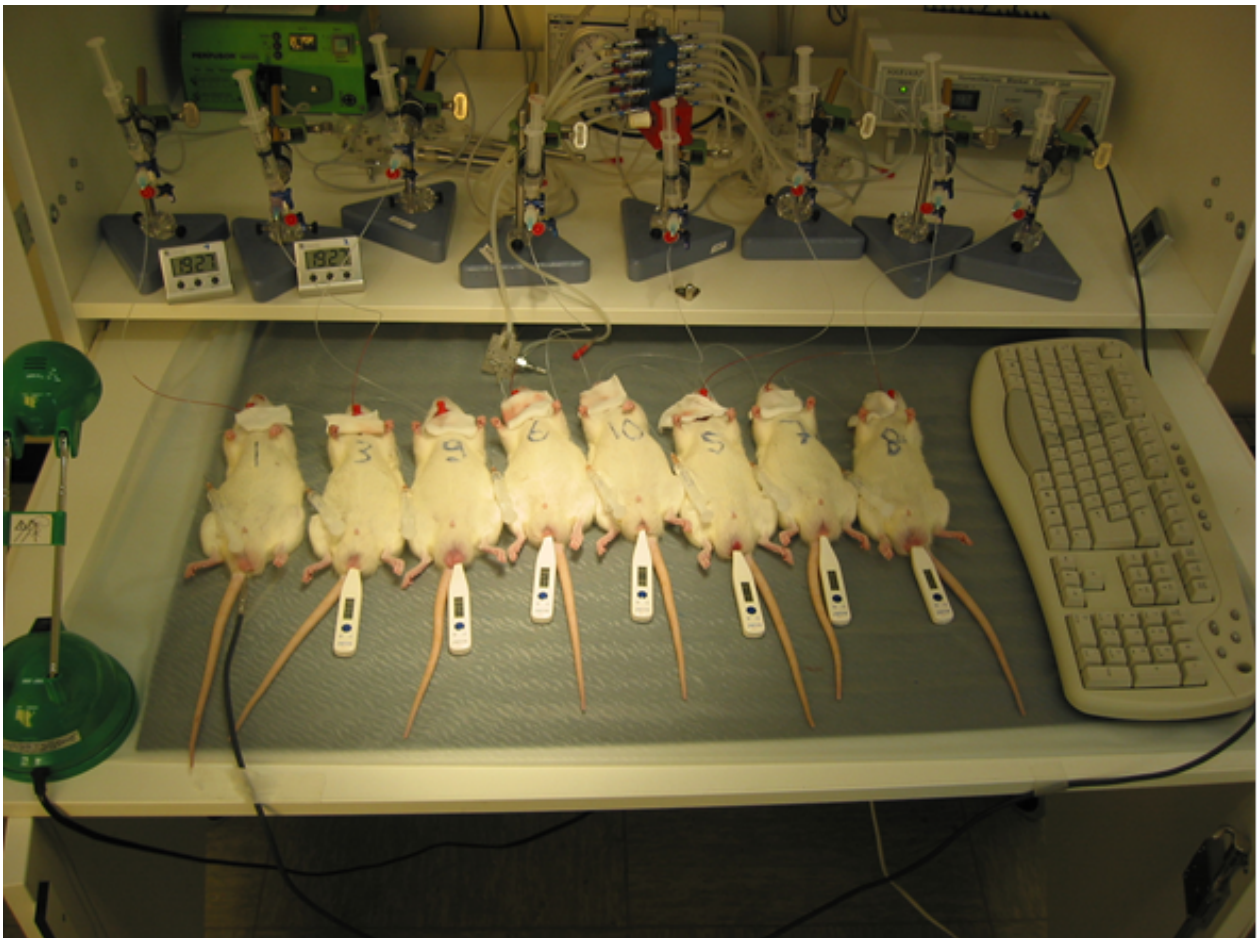


Abbildung 10: Versuchsaufbau des Rattenmodells

Zu Beginn der Stimulationsversuche (24 Stunden nach Vorbehandlung) wurden die narkotisierten Ratten zur Sicherung der Atemwege tracheotomiert. Anschließend wurde ein Zentraler Venenkatheter (ZVK) in die V. jugularis interna eingebracht. Die 6-stündige Aufzeichnung des arteriellen Mitteldrucks (MAD) erfolgte mit Hilfe eines, an die ebenfalls kanülierte Arteria carotis angeschlossenen Druckwandlers. Um ein Auskühlen der Tiere zu verhindern, wurde die Körperkerntemperatur rektal gemessen und ggf. mit Wärmematten konstant gehalten.

2.6 Bestimmung von Nitrat und Nitrit

2.6.1 Griess Assay

Da NO ein äußerst instabiles und somit extrem reagibles Radikal ist, besteht es in biologischen Systemen für lediglich 2-3 Sekunden. Demzufolge ist die direkte Ermittlung des Plasmagehaltes von NO ausschließlich über teure und komplizierte Elektronenspinresonanz- und Sondenmessungen möglich. Eine sehr viel einfachere und preisgünstigere Methode ist die indirekte Quantifizierung von NO. Diese kann über die weitaus stabileren NO-Metabolite Nitrit (NO_2) und Nitrat (NO_3) erfolgen.

Hierzu entwickelte Johann Peter Griess ein nach ihm benanntes Verfahren, das auf der Nitrit-abhängigen Bildung eines spektrophotometrisch messbaren Diazofarbstoffes basiert (Knowles und Moncada, 1994; Moshage et al., 1995). Da 95 % des im Vollblut vorhandenen Nitrits innerhalb einer Stunde zu Nitrat oxidiert werden, muss zu Versuchsbeginn sämtliches in den Proben vorhandene Nitrat zu Nitrit reduziert werden. Dazu werden die Proben mit der Nitratreduktase und den Elektronendonatoren Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) inkubiert (Garrett und Nason, 1967). Anschließend wird überschüssiges NADPH, das in seiner reduzierten Form mit der Nitritmessung interferieren würde, durch Zugabe eines weiteren Elektronenakzeptors (zum Beispiel Pyruvat) sowie eines Katalysators (zum Beispiel der Laktatdehydrogenase) oxidiert (Medina und Nicholas, 1957). Die danach durch Zugabe des Griess Reagenz ausgelöste Farbreaktion entsteht durch 2 Reaktionsschritte:

Zuerst bildet Nitrit mit Sulfanylsäure eine Diazoverbindung (4-Diazobenzolsulfonsäure). Danach kondensiert diese mit Diamin zu einem violett-roten Azofarbstoff. Dieser Arbeitsschritt stellt die eigentliche Griess Reaktion dar. Die Intensität der entstandenen Färbung ist proportional zur Nitritkonzentration der Proben und kann nun durch spektrophotometrische Analyse der Proben ermittelt werden. Um Messfehlern aufgrund von frühzeitiger Komplexbildung vorzubeugen, wird das Griess Reagenz erst unmittelbar vor Gebrauch aus gleichen Teilen der Griess A und Griess B Lösung zusammengefügt.

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien für den Griess Assay

Mit Hilfe des *Griess Assays* gelang eine einfache und preisgünstige, indirekte Quantifizierung von Stickstoffmonoxid (NO) im Blutplasma der Ratten. Sie erfolgte über die weitaus stabileren NO-Metabolite Nitrat (NO₃) und Nitrit (NO₂). Folgende Reagenzien wurden zur Durchführung des Griess Assays verwendet:

	Chemikalie	Menge
Phosphorsäure (5 %)	Phosphorsäure	588 µl
	Aqua dest.	9,422 ml
Natriumnitrat	Natriumnitrat	34,5 mg
	NaCl (0,9 %)	50 ml
Natriumnitrit	Natriumnitrit	42,5 mg
	NaCl (0,9 %)	50 ml
Nitratreduktase (10 U/ml)	Nitratreduktase	12 ml
	NaCl (0,9 %)	2 ml
LDH	Laktatdehydrogenase	0,2 ml
	NaCl (0,9 %)	0,8 ml
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	0,1 ml
	NaCl (0,9 %)	0,9 ml
Natriumpyruvat	Natriumpyruvat	110 mg
	NaCl (0,9 %)	1 ml
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat	2,1 mg
	NaCl (0,9 %)	1 ml
Griesslösung	Griess A	5 ml
	Griess B	5 ml

Tabelle 5: Nitrit- und Nitrat-Eichlösungsreihe

Die spektrophotometrische Messung der NO Konzentration bedurfte sowohl einer Nitrit- als auch einer Nitrat-Eichlösungsreihe. Diese wurden folgendermaßen hergestellt:

Konzentration	NaNO ₃ bzw. NaNO ₂	NaCl
10 %	100 µl	900 µl
9 %	90 µl	910 µl
8 %	80 µl	920 µl
7 %	70 µl	930 µl
6 %	60 µl	940 µl
5 %	50 µl	950 µl
4 %	40 µl	960 µl
3 %	30 µl	970 µl
2 %	20 µl	980 µl
1 %	10 µl	990 µl
0 %	0 µl	1000 µl

Durchführung des Griess Assays:

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden je 50 µl der Eichlösungen bzw. der Plasmaproben als Doppelansatz in eine 96 Loch Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 15-minütiger Bebrütung mit je 10 µl Nitratreduktase, FAD und NADPH, folgte ein weiterer 5-minütiger Inkubationsschritt mit je 10 µl Laktatdehydrogenase (LDH) und Pyruvat. Beide Inkubationen fanden bei 37 °Celsius im Brutschrank statt. Anschließend konnte die eigentliche Griess Reaktion durch Zusatz von 100 µl des frisch angemischten Griess Reagenz gestartet und der Nitritgehalt der Proben nach 5 Minuten Einwirkzeit bei einer Wellenlänge von 550 nm spektrophotometrisch bestimmt werden.

2.7 Relative Quantifizierung des Proteingehalts einer Gewebeprobe

2.7.1 Homogenisierung

Zur Erstellung eines verwendbaren Proteinlysates wird das Gewebe sowohl mechanisch als auch chemisch behandelt. Die chemische Zersetzung erreicht man durch Zugabe eines Lysepuffers. Dieser enthält neben den für die Isolation von Proteinen nötigen Detergenzien auch Proteinaseinhibitoren. Diese sollen vor unerwünschtem Proteinabbau durch ebenfalls während des Lysevorganges freigesetzte Proteasen schützen. Unterstützend wird das Gemisch aus Gewebe und Lysepuffer so lange mit Hilfe einer Rührwerkmaschine zerkleinert, bis makroskopisch keine festen Bestandteile mehr zu erkennen sind. Nach der darauf folgenden Zentrifugation, deren Geschwindigkeit und Dauer je nach Molekülmasse des Zielproteins schwankt, ist das gewünschte Proteinlysate von den festen Bestandteilen getrennt und kann problemlos abpipettiert werden.

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien für den Lysepuffer

Die Homogenisierung diente der Produktion von verwendbaren Proteinlysaten. Hierzu wurde das Lungengewebe sowohl mechanisch als auch chemisch behandelt. Folgende Reagenzien fanden bei der Herstellung des Lysepuffers Verwendung:

	Chemikalie	Menge
Tris HCL (500 mM)	Tris HCL	15,76 g
	Aqua dest.	200 ml
	5 N NaOH	pH 7,4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	146,1 g
	NaOH (1N)	50 ml
SDS	Sodiumdodecylphosphat (SDS)	1 g
	Aqua dest.	100 ml
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	10 mg
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	300 µl
Aprotinin	Aprotinin	5 mg
	Aqua dest.	1 ml
Natriumdesoxycholat	Natriumdesoxycholat	0,5 g
	Aqua dest.	5 ml
Leupeptin	Leupeptin	5 mg
	Aqua dest.	1 ml

Tabelle 7: Lysepuffer für die Homogenisierung

Die chemische Zerkleinerung des Lungengewebes erfolgte mit Hilfe des sogenannten Lysepuffers.¹⁾ Die Proteinaseinhibitoren EDTA, PMSF, Aprotinin und Leupeptin wurden erst kurz vor Gebrauch hinzugefügt.²⁾ Die Menge des hinzugefügten 5 N NaOH wurde für jeden Lysepufferansatz individuell durch Titration bis zu einem pH von 7,4 bestimmt. Folgende Chemikalien wurden zur Herstellung des Lysepuffers genutzt:

	Chemikalie	Menge
Lysepuffer	NaCl 0,9 %	438,5 mg
	Tris HCl (pH 7,4)	5 ml
	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	5 ml ¹⁾
	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	260 µl ¹⁾
	Triton X-100	500 µl
	Natriumdesoxycholat	5 ml
	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	5 ml
	Aprotinin	50 µl ¹⁾
	Leupeptin	50 µl ¹⁾
	Aqua dest.	30 ml
	5 N NaOH	bis pH 7,4 ²⁾

Durchführung der Homogenisierung:

Für die Homogenisierung wurde ein Viertel der jeweiligen Rattenlunge grob mit dem Skalpell zerkleinert und anschließend mit 3 µl Lysepuffer versetzt. Nach mechanischer Zerkleinerung mit einer Rührwerkmühle wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °Celsius und 10000 *relative centrifugal force* (rcf) zentrifugiert und der überstehende Proteinextrakt abpipettiert. Zur Vermeidung unerwünschter Denaturierungsprozesse wurde während des gesamten Arbeitsvorganges auf eine kontinuierliche Kühlkette geachtet.

2.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der nach seiner Erstbeschreiberin Marion Bradford benannte Test ist eine gängige Untersuchungsmethode zur Ermittlung der Gesamtproteinmenge eines Homogenisates. Er basiert auf einer Komplexbildung zwischen dem im sauren Bradford Reagenz enthaltenen Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau und den kationischen sowie nichtpolaren Seitenketten der in einer Probe vorhandenen Proteine. Durch diese Reaktion wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten Sulfonatform stabilisiert und kann durch spektrophotometrische Messung im Wellenlängenbereich von 595 nm Aufschluss über den Proteingehalt der Proben geben.

Aufgrund einer über einen weiten Bereich von Proteinkonzentrationen nicht-linearen Farbentwicklung sollte jedoch bei jedem Versuchsansatz eine neue Proteinstandardkurve angelegt werden (Bradford, 1976; Stoscheck, 1990).

Durchführung der Proteinbestimmung nach Bradford:

Da mit sehr hohen Proteinmengen gerechnet werden konnte, wurden die einzelnen Proben sowie der reine Lysepuffer vor Zusatz des Bradford Reagenz im Mischungsverhältnis 1:20 mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) verdünnt. Anschließend wurden 10 µl der Eichreihe bzw. der verdünnten Proben als Doppelansatz in eine 96 Loch Mikrotiterplatte gefüllt und 200 µl Bradford Reagenz hinzugefügt. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Proteinkonzentrationen anhand der entstandenen Farbentwicklung bei einer Wellenlänge von 595 nm spektrophotometrisch bestimmt.

Tabelle 8: Proteinstandardreihe für den *Bradford Assay*

Der *Bradford Assay* diente der Bestimmung der Gesamtproteinmenge der Proteinlysate. Aufgrund einer über einen weiten Bereich von Proteinkonzentrationen nicht-linearen Farbentwicklung wurde bei jedem Versuchsansatz eine neue Proteinstandardkurve angelegt. Diese setzte sich aus folgenden Mischungsverhältnissen zusammen:

	Chemikalie	Menge
BSA Stammlösung	bovines Serumalbumin (BSA)	10 mg
	Aqua dest.	1 ml
Proteinstandardreihe	BSA Stammlösung	Aqua dest.
10 %	100 µl	900 µl
9 %	90 µl	910 µl
8 %	80 µl	920 µl
7 %	70 µl	930 µl
6 %	60 µl	940 µl
5 %	50 µl	950 µl
4 %	40 µl	960 µl
3 %	30 µl	970 µl
2 %	20 µl	980 µl
1 %	10 µl	990 µl
0 %	0 µl	1000 µl

2.7.3 Gelelektrophorese

Die 1970 von Laemmli beschriebene *SDS PAGE* (Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese) gilt bis heute als Methode der Wahl, um die in einem Analysat enthaltenen Proteine größenspezifisch aufzutrennen (Laemmli, 1970). Zugrunde liegt ihr folgendes Prinzip: Die Wanderungsgeschwindigkeit von Makromolekülen ist in einem elektrischen Feld im Allgemeinen proportional zu ihrer Gesamtladung und antiproportional zu ihrer Masse. Gelingt es jedoch, eine einheitliche Gesamtladung und Form aller Proteine zu erreichen, so ist ihre Laufgeschwindigkeit nur noch von ihrem Molekulargewicht abhängig. Dies erreichte Laemmli durch Kochen der Proben in dem nach ihm benannten Puffer. Das darin enthaltene SDS bindet an hydrophobe Proteinregionen und führt durch seine anionische Kopfgruppe zu einer hohen negativen Gesamtladung der entstandenen SDS-Proteinkomplexe. Darüber hinaus bindet ein Gramm Protein stetig etwa 1,4 Gramm SDS, sodass dadurch ein stabiles Verhältnis von Ladung zu Masse erreicht wird. Zusätzlich enthaltenes β -Mercaptoethanol stellt dabei durch Spaltung hinderlicher Disulfidbrücken die zur Komplexbildung notwendige uneingeschränkte Erreichbarkeit sämtlicher SDS-Bindungsstellen sicher. Weiterhin besitzt SDS eine stark denaturierende Wirkung, die sowohl die Tertiär- als auch die Sekundärstruktur der Proteine zerstört. Dementsprechend haben sämtliche Proteine im Laemmli-puffer die einheitliche Form schlichter, ausgestreckter Polypeptidketten, deren Durchmesser konstant und deren Länge proportional zum Molekulargewicht ist. Außerdem werden dem Laemmli-puffer noch Glycerol zum zügigen Absinken der pipettierten Proben in die jeweiligen Geltaschen und Bromphenolblau zum Sichtbarmachen der eingefüllten Analysate hinzugefügt. Die Gelelektrophorese wird mit Hilfe sogenannter Polyacrylamidgele durchgeführt. Gibt man zu einer Acrylamidmischung den Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und den Katalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED), so verknüpfen sich die vorhandenen Acrylamid-Monomere zu langen Ketten, die anschließend durch Bisacrylamid quervernetzt werden. Dabei variiert die Porengröße des entstandenen Siebes in Abhängigkeit von der Acrylamidkonzentration und des Acrylamid zu Bisacrylamid Verhältnisses. Erstellt man ein aus einem Trenngel und einer darüber liegenden Schicht Sammelgel bestehendes, diskontinuierliches Polyacrylamidgel, so ermöglicht dies die Analyse besonders großer Probenmengen. Dabei macht

man sich die starke Komprimierung der Analysate durch folgende zwei Mechanismen zu Nutze:

1) Bei dem im Sammelgel herrschenden pH von 6,8 liegen sämtliche im Laufpuffer enthaltenen Glycinmoleküle als Zwitterionen und damit ungeladen vor. Im Gegensatz dazu weist das in den Proben und im Gel enthaltene Chlorid eine negative Ladung auf. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung werden die Chloridionen von der Kathode abgestoßen und strömen, gefolgt von den bedeutend größeren und daher langsameren SDS Proteinkomplexen, in Richtung der Anode. Dahinter laufen nur noch die aufgrund ihrer Elektroneutralität extrem langsam fließenden Glycinmoleküle. Zwischen ihnen und den führenden Chloridionen entsteht dadurch eine Zone hoher elektrischer Feldstärke, die zu einer ersten Kompression der Analysate führt.

2) Erreichen die Proteine die Trenngelgrenze, wird dieser Effekt noch verstärkt: Da die Porengröße im Trenngel bedeutend feiner ist, werden sämtliche Moleküle abgebremst und so abermals gestaucht.

Sind die Proben dann im basischen Trenngel (pH 8,8) angekommen, überholen die kleinen und nun negativ geladenen Glycinionen die pipettierten Analysate, sodass letztere sich nun ihrem Molekulargewicht entsprechend fortbewegen können und dadurch aufgetrennt werden. Neben den eigentlichen Proben laufen im Allgemeinen auch ein Proteinstandard und ein *Rainbowmarker* in der Elektrophorese mit.

Beide dienen sowohl der Kontrolle der Ergebnisse als auch der Orientierung auf Gelmatrix, Trägermembran und entwickeltem *Blot*.

Tabelle 9: Verwendete Reagenzien für die Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente der gröÙenspezifischen Auftrennung der Proteinlysate.

¹⁾ Das Mercaptoethanol wurde erst kurz vor Verwendung des Puffers hinzugefügt.

²⁾ Die Menge der benötigten Säure oder Lauge wurde für jeden Ansatz individuell durch Titration bis zu dem benötigten pH bestimmt.

	Chemikalie	Menge
HO-1 Standard	HO-1-Standard	2,34 µl
	Laemmlipuffer	997,66 µl
APS	Ammoniumpersulfat (APS)	1 g
	Aqua dest.	10 ml
Tris HCl (500 mM)	Tris HCl	15,76 g
	Aqua dest.	200 ml
	5 N NaOH	bis pH 6,8 ²⁾
Laemmlipuffer	Aqua dest.	6 ml
	Tris HCl (pH 6,8)	1 ml
	Glycerol	2 ml
	Natriumdodecylsulfat	1 g
	Bromphenolblau	30 mg
	β- Mercaptoethanol	1ml ¹⁾
Laufpuffer (täglich frisch)	Sigma 7-9	3 g
	Glycine	14,4 g
	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	1 g
	Aqua dest.	1 l
Trenngelpuffer (monatlich frisch)	Sigma 7-9	45,4 g
	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	1 g
	Aqua dest.	200 ml
	6 N HCl	bis pH 8,8 ²⁾
Sammelgelpuffer (monatlich frisch)	Sigma 7-9 (0,675 M)	15,1 g
	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	1 g
	Aqua dest.	200 ml
	6 N HCl	bis pH 6,8 ²⁾

Tabelle 10: Mischungsverhältnis der Polyacrylamidgele

Das Mischungsverhältnis der Polyacrylamidgele war für die größenspezifische Auftrennung der Proteine von großer Bedeutung.¹⁾ Der Radikalstarter Ammoniumpersulfat sowie der Polymerisierungskatalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurden erst kurz vor Gießen der Gele hinzugefügt. In dieser Arbeit wurden folgende Mischungsverhältnisse verwendet:

	Chemikalie	Menge
Trenngel (15 %)	Acrylamid / Bisacrylamid	20 ml
	Trenngelpuffer	8 ml
	Aqua dest.	11,8 ml
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	40 µl
	Ammoniumpersulfat (APS)	200 µl
Sammelgel (4 %)	Acrylamid / Bisacrylamid	2,6 ml
	Sammelgelpuffer	4 ml
	Aqua dest.	13,2 ml
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	20 µl ¹⁾
	Ammoniumpersulfat (APS)	100 µl ¹⁾

Durchführung der Gelelektrophorese

Zur Herstellung der Gelmatrizen wurde die 15-prozentige Polyacrylamidlösung, möglichst blasenfrei, in die zuvor mit 80-prozentigem Alkohol gereinigten Glasvorrichtungen gegossen. Da in der Raumluft enthaltener Sauerstoff die zur Polymerisierung notwendigen Radikale abfangen könnte und dadurch eine korrekte Polymerisierung der Gele verhindern würde, wurden die Gele unverzüglich mit einer dünnen Schicht Isopropanol überzogen. Über den luftdichten Verschluss hinaus besaß diese Schutzschicht auch einen glättenden Charakter. War die Trenngelschicht nach circa 30 Minuten ausgehärtet, konnte das Isopropanol entfernt und das frisch angesetzte, 4-prozentige Polyacrylamidgel eingefüllt werden. Dabei entstanden die benötigten Geltaschen durch Einsatz eines speziellen Kammes, der darüber hinaus die zuvor vom Isopropanol vermittelte Schutzfunktion übernehmen konnte.

Während nun auch die Sammelgelschicht aushärten musste, wurden die Proben 1:1 mit Laemmlipuffer verdünnt und für 5 Minuten bei 95 °Celsius gekocht. Außerdem konnte die Zwischenzeit zur Berechnung der zur Analyse von 100 µg Gesamtproteinmenge benötigten Probenportionen genutzt werden. Einmal ausgehärtet, wurden die fertiggestellten Gele in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur gespannt und sowohl die Probenportionen als auch je 10 µl *Rainbowmarker* und HO-1-Proteinstandard in die jeweils dafür vorgesehenen Geltaschen pipettiert. Danach wurde die eigentliche Gelelektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 100 Volt gestartet. Hatte die anhand der Bromphenolblau Färbung erkennbare Lauffront der Proben das untere Ende des Gels erreicht, war dies ein Zeichen dafür, dass die kleinsten und somit schnellsten Proteine das Gel durchwandert hatten und die Auftrennung beendet werden konnte.

2.7.4 *Western Blot*

Da sich Polyacrylamidgele schlecht zur Weiterverarbeitung eignen, werden die Proteine mit Hilfe des *Western Blot* Verfahrens auf ein strapazierfähigeres Medium übertragen. Hierzu sind Nitrozellulosemembranen aufgrund ihrer hohen Proteinaffinität und Bindungskapazität besonders geeignet (Burnette, 1981; Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979).

Während des *Western Blottings* wandern die weiterhin negativ geladenen Proteine nach Anlegen einer elektrischen Spannung von dem der Kathode zugewandten Gel auf die der Anode zugewandte Nitrozellulosemembran. Dabei wird die Effizienz und Vollständigkeit der Übertragung durch die Anwendung der sogenannten Sandwich-Technik maximiert. Diese Vorgehensweise garantiert einen möglichst dichten, luftblasenfreien und unter konstantem Anpressdruck stehenden Zusammenhalt von Gel und Membran. Im Gegensatz zur Elektrophorese ist der Stromfluss während des Proteintransfers jedoch waagrecht ausgerichtet, sodass sich sämtliche Eiweiße unter Beibehaltung ihres senkrechten Auftrennungsmusters bewegen und schließlich durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Trägermembran haften bleiben.

Dabei befindet sich das sogenannte *Western Blot Sandwich* während der gesamten Proteinübertragung in einem Methanol-haltigen Transferpuffer, der sowohl die Lösung der Proteine aus der Gelmatrix als auch das Auswaschen des SDS aus den SDS-

Proteinkomplexen vermittelt. Letzteres führt zur Renaturierung der Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine und macht sie dadurch für die folgende Immundetektion nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion erkennbar. Um jedoch zu verhindern, dass die dafür verwendeten Antikörper auch unspezifisch an die verbliebenen freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran binden, werden diese nach Beendigung des *Western Blottings* durch Inkubation mit einem für den Primärantikörper nicht erkennbaren Protein blockiert.

Tabelle 11: Verwendete Reagenzien für den *Western Blot*

Die sehr empfindlichen Polyacrylamidgele waren zur Weiterverarbeitung nicht geeignet. Daher wurden die Proteine unter Beibehaltung ihres Auftrennungsmusters mit Hilfe des *Western Blot* Verfahrens auf ein strapazierfähigeres Medium übertragen. Hierzu wurden folgende Reagenzien gebraucht:

	Chemikalie	Menge
Transferpuffer	Aqua dest.	800 ml
	Sigma	3 g
	Glycin	14,4 g
	Methanol	200 ml
PBS	Aqua dest.	1000 ml
	Natriumchlorid	8,0 g
	Kaliumchlorid	0,2 g
	Dinatriumhydrogenphosphat	1,44 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	0,24 g
Blockierungslösung (10 %)	<i>Phosphat buffered saline</i> (PBS)	200 ml
	Tween 20	0,5 ml
	Milchpulver	20 g

Durchführung des *Western Blottings*:

Bevor die aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran übertragen wurden, musste das *Western Blot Sandwich* angefertigt werden. Dazu wurden die Polyacrylamidgelen aus ihrer Glashalterung gelöst und das Sandwich aus den zuvor in Transferpuffer getränkten Einzelteilen folgendermaßen aufgebaut:

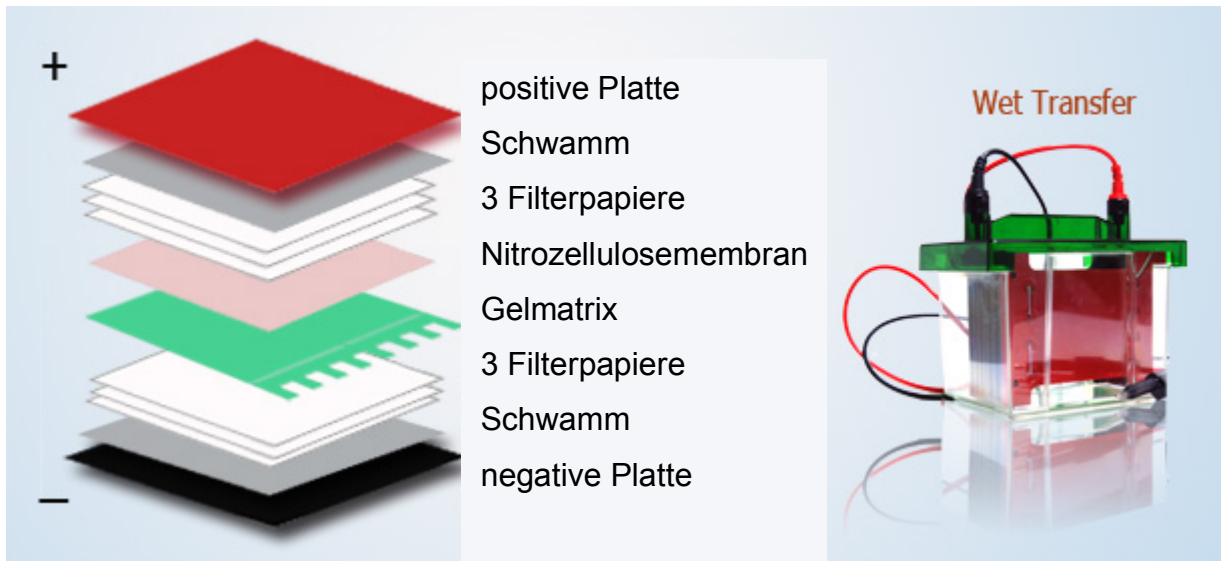


Abbildung 11: Aufbau des *Western Blot Sandwiches*

Der Aufbau des *Western Blot Sandwiches* ermöglichte die horizontale Übertragung der durch die Gelelektrophorese bereits separierten Proteine. Hierbei blieb ihr Auftrennungsmuster erhalten. Der Transfer fand in einer mit Transferpuffer gefüllten, eisgekühlten Transferkammer (Bild rechts) statt. Er erfolgte ladungsabhängig von der negativen zur positiven Platte, das heißt, von der Gelmatrix zur Nitrozellulosemembran.

Hierbei musste der Einschluss von Luftblasen strengstens vermieden werden, weil er die Proteinübertragung an den betreffenden Stellen verhindert hätte. Vor Beginn des Transfers wurde das fertige *Blot Sandwich* in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Eisblock, der dem durch den Stromfluss entstehenden Temperaturanstieg entgegenwirken sollte, hinzugefügt. Dann wurde der 2-stündige Proteintransfer bei einer Spannung von 100 Volt durchgeführt. Schließlich erfolgte die Inkubation der Nitrozellulosemembranen zur Blockierung der restlichen Proteinbindungsstellen über Nacht bei 4 °Celsius in einer 10-prozentigen Blockierlösung.

2.7.5 Immundetektion

Im ersten Schritt der darauf folgenden Immundetektion werden die Nitrozellulosemembranen mit einer Antikörperlösung inkubiert. In ihr befindet sich neben dem ersten Primärantikörper, der gegen das zu bestimmende Protein gerichtet ist, häufig noch ein zweiter Primärantikörper, der das exprimierte Protein eines der sogenannten Haushaltsgene detektiert. Diese Gene kodieren für Eiweiße, die für den Erhalt der Zelle grundsätzlich notwendig sind und daher ständig in gleichbleibender Menge produziert werden. Die Detektion eines solchen Proteins kann daher später als Kontrolle einer äquivalenten Proteinbeladung der einzelnen Proben verwendet werden.

Während des zweiten Inkubationsschrittes werden die auf der Nitrozellulosemembran gebundenen Primärantikörper selbst zum Epitop für den nun verwendeten Sekundärantikörper. Dieser ist zur Vereinfachung seiner Detektion an ein Enzym gekoppelt, das eine Farb- oder Chemilumineszenzreaktion auslösen kann. Hierfür wird häufig die Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, *HRP*) genutzt. Sie katalysiert die Oxidation von Luminol. Die dabei entstehende Lumineszenz ist proportional zu der Menge des gesuchten Proteins. Durch Belichtung von densitometrisch auswertbaren Röntgenfilmen kann somit indirekt die Proteinmenge berechnet werden.

Tabelle 12: Verwendete Reagenzien für die Immundetektion

Zur Detektion der gesuchten Proteine werden die Nitrozellulosemembranen mit Antikörpern inkubiert und anschließend nach Auslösung einer Lumineszenzentwicklung und Belichtung eines Röntgenfilmes densitometrisch gemessen. Hierzu wurden folgende Reagenzien verwendet:

	Chemikalie	Menge
Blockierungslösung (5 %)	<i>Phosphat buffered saline</i> (PBS)	200 ml
	Tween 20	0,5 ml
	Milchpulver	10 g
TPBS (Waschlösung)	<i>Phosphat buffered saline</i> (PBS)	400 ml
	Tween	1 ml
Primärantikörperlösung	Blockierungslösung (5 %)	40 ml
	Anti HO-1 Antikörper	20 µl
	Anti β – Aktin	10 µl
Sekundärantikörperlösung	Blockierungslösung (5 %)	50 ml
	Anti Kaninchen IgG:HRP Konjugat	10 µl
	Anti Maus IgG:HRP Konjugat	10 µl

Durchführung der Immundetektion:

Zur Immundetektion wurden die Nitrozellulosemembranen nacheinander für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur in der ersten und anschließend in der zweiten Antikörperlösung geschwenkt. Vor und nach jeder Inkubation erfolgten je drei 5-minütige Waschvorgänge mit TPBS. Am Ende des letzten Waschvorganges wurde das verwendete Tensid Tween durch 5-minütiges Schwenken in reinem PBS entfernt. Anschließend konnten die Membranen für 3 Minuten mit der unmittelbar vor Gebrauch angesetzten Luminollösung inkubiert werden. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten in einer Dunkelkammer. Nach Abgießen der Luminollösung wurden die Membranen zuerst zu ihrem Schutz luftblasenfrei in Folie verbracht, dann mit einem Röntgenfilm bedeckt und schließlich für 3 Minuten in einer Röntgenkassette eingeschlossen. Da die Schwärzung der Röntgenfilme proportional zum Ausmaß der Lumineszenzentwicklung und ergo der HO-1-Proteinkonzentration war, konnte diese durch die densitometrische Auswertung der Röntgenfilme nun auch semiquantitativ gemessen werden. Als Software diente hierzu die Scion Image Software (Scion Corporation, Maryland, USA).

2.8 Myeloperoxidase Aktivitätsassay

Das 150 kDa große Enzym Myeloperoxidase (MPO) katalysiert die Oxidation von Chloridionen zu Hypochloridionen. Bei dieser Redoxreaktion stellt Wasserstoffperoxid die benötigten Elektronen bereit und fungiert somit als Oxidationsmittel. Gibt man zu einem durch chemische und mechanische Lyse erstellten Homogenisat O-Dianisidin Dihydrochlorid, so wird dieses farblose Substrat in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch die in der Probe enthaltene MPO zu einem orangeroten Farbstoff reduziert. Um einen optimalen Umsatz zu garantieren, sollte das gegebene pH-Optimum der MPO während des gesamten Versuchs durch den Zusatz eines Kaliumphosphatpuffers stabilisiert werden. Da die entstandene Farbentwicklung proportional zur Aktivität der MPO ist, kann letztere nach spektrophotometrischer Bestimmung der Extinktion indirekt angenähert werden (Bradley et al., 1982a; Bradley et al., 1982b).

Tabelle 13: Verwendete Reagenzien für den MPO Aktivitätsassay

Die Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität ist ein Surrogatparameter für die Aktivität von Neutrophilen Granulozyten und lässt somit auch Rückschlüsse auf den durch sie entstandenen Gewebeschaden zu. ¹⁾Hydrogenperoxid wurde der Lösung erst unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt. Zur Messung der MPO-Aktivität wurden die folgenden Chemikalien benötigt:

	Chemikalie	Menge
Dikaliumphosphatlösung	Dikaliumphosphat	871 mg
	Aqua dest.	100 ml
HTAB Puffer	Aqua dest.	100 ml
	Kaliumdihydrogenphosphat	680 mg
	Hexadecyltrimethylammoniumbromid	500 mg
	0,5 M Dikaliumhydrogenphosphat	bis pH 6,0
O-Dianisidine	Aqua dest.	2 ml
Dihydrochloridlösung	O-Dianisidine Dihydrochlorid	20 mg
	Hydrogenperoxid	0,2 ml ¹⁾
	Dikaliumphosphatlösung	17,8 ml

Durchführung Myeloperoxidase Aktivitätsassay:

Zu Beginn wurde das zuvor gewogene Lungengewebe mit 1 ml eisgekühltem Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB) Puffer versetzt und sowohl mit einer Rührwerk- mühle als auch mit einem Ultraschallhomogenisator für 30 Sekunden mechanisch zer- kleinert. Nach 15-minütiger Zentrifugation mit 14000 g bei 4 °Celsius wurde der Über- stand abgeschöpft und gesammelt. Das noch verbleibende Sediment wurde abermals mit 1 ml Lysepuffer verdünnt, für 10 Sekunden ultraschallhomogenisiert und mit 14000 g für 15 Minuten bei 4 °Celsius zentrifugiert. Gleichsam zur ersten Zentrifugation wurde der Überstand erneut abgetragen und der Lysierungsvorgang noch ein letztes Mal wiederholt. Sämtliche Arbeitsschritte außerhalb der Zentrifuge fanden hierbei auf Eis statt.

Der nach insgesamt 3 Extraktionsprozeduren gesammelte Überstand enthielt nun nahezu die gesamte in der Probe vorhandene Menge der MPO. Um ihre Aktivität nun auch messen zu können, wurden zweimal je 25 µl der gewonnenen Extrakte in 96-Loch

Mikrotiterplatten pipettiert und 125 µl der O-Dianisidin Dihydrochlorid Lösung hinzugefügt. Eine und drei Minuten nach Substratzusatz wurde die Extinktion der Proben spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die daraufhin berechneten Extinktionsänderungen zwischen den beiden Messzeitpunkten wurden mit dem Faktor 13,5 multipliziert, sodass eine Einheit MPO-Aktivität schließlich die Menge an MPO widerspiegelte, die 1 µmol Wasserstoffperoxid pro Minute reduziert hatte. Um abzusichern, dass Unterschiede in den einzelnen Messreihen nicht zu falschen Gesamtergebnissen führten, wurden die Einzelergebnisse jeweils als Vielfaches der jeweiligen Kontrolle angegeben.

2.9 *Wet-to-dry ratio*

Das Ausmaß eines Lungenödems kann unter anderem durch die *wet-to-dry ratio* (WTDR) beurteilt werden. Hierbei werden die Organe so lange in einem Trockenschrank gelagert, bis sämtliche Ödemflüssigkeit verdunstet ist. Setzt man das Entnahmegewicht des Organs in Relation zu seinem Trockengewicht, so spiegelt der Wert des erhaltenen Quotienten das Ausmaß des Lungenwassers wieder.

Durchführung der WTDR:

Zur Ermittlung der WTDR wurden Stücke der Lunge im aufgetauten Zustand (Tag 0) gewogen und anschließend bei 37 °Celsius im Trockenschrank gelagert. In den darauf folgenden Tagen wurde das aktuelle Gewicht täglich notiert, sodass das verdunstete Lungenödem anhand des Gewichtsverlustes berechnet werden konnte. Nachdem das Gewicht am Tag 5 stagnierte und auch am Tag 6 keine weitere Abnahme festzustellen war, konnte von einer vollständigen Verdunstung des Lungenödems ausgegangen werden. Nun wurde das Ausmaß des Lungenödems anhand des Quotienten:

Ausgangsgewicht der Lunge am Tag 1

Trockengewicht der Lunge am Tag 5

berechnet. Die Größe des erhaltenen Wertes war dabei proportional zur Ausprägung des aufgetretenen Lungenödems.

2.10 Statistik

Sämtliche Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Analyse fand zuvor unter Nutzung des ANOVA und *Bonferroni Posthoc* Tests statt. Zum Vergleich von nur zwei Versuchsgruppen wurde der *Wilcoxon Matched Pair* Test angewendet. Falls die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war, wurde der mögliche Zusammenhang zwischen den einzelnen Messgrößen als signifikant angesehen. Für sämtliche Analysen wurde die Software *GraphPad Prism V.4.0* (GraphPad, LaJolla, CA, USA) genutzt.

3. Ergebnisse

3.1 iNOS-Funktion und -Inhibition

Vor Beginn der Toleranzversuche fand die Untersuchung der iNOS-Funktion und des eingesetzten iNOS-Inhibitors 1400W statt.

Zunächst wurde den Versuchstieren hierzu entweder NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.), LPS (1 mg/kg i.p.) oder LPS (1 mg/kg i.p.) und 1400W (5 mg/kg i.p.) appliziert. 8 bzw. 16 Stunden nach Vorbehandlung wurde die Konzentration von Nitrat und Nitrit mit Hilfe des Griess Assays gemessen. Die Plasmakonzentration von Nitrit ist ein indirekter Indikator für die iNOS-Aktivität. Als Kontrolle dienten Tiere, die lediglich eine NaCl-Gabe erhalten hatten.

Zu beiden Abnahmezeitpunkten zeigte sich nach alleiniger Stimulation mit LPS eine im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant höhere Konzentration von Nitrat und Nitrit im Blutplasma ($p < 0,05$).

8 Stunden nach Stimulation war die Plasmanitritkonzentration in den Tieren, die zusätzlich zu LPS mit dem iNOS-Inhibitor 1400W vorbehandelt wurden, im Vergleich zu den Ratten, die ausschließlich LPS erhalten hatten, wieder signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). Weitere 8 Stunden später war dieser inhibitorische Effekt noch nachweisbar, allerdings nicht mehr signifikant.

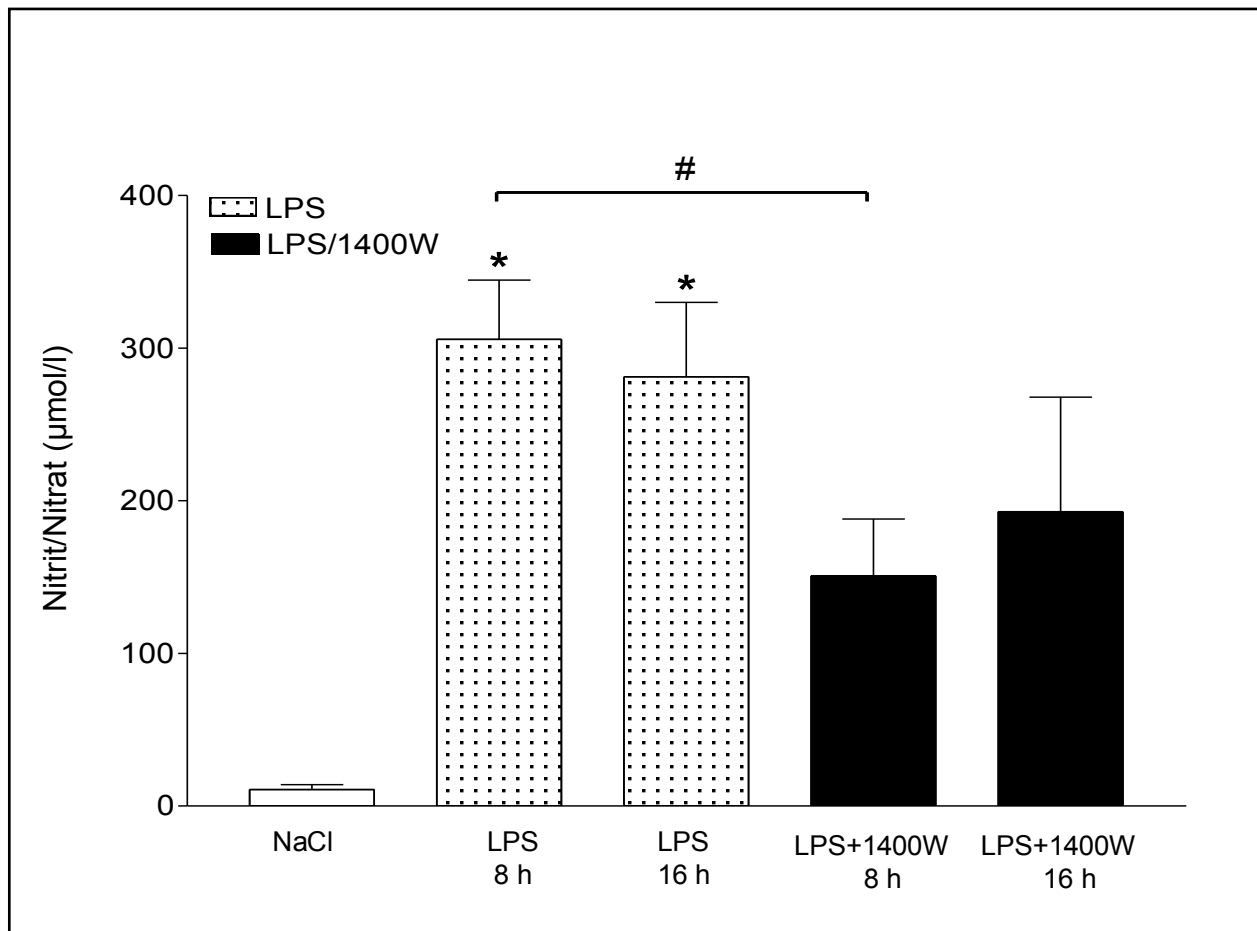


Abbildung 12: Plasmanitritkonzentration

8 bzw. 16 Stunden nach Injektion von NaCl (1 ml/kg i.p.), Lipopolysaccharid (LPS: 1 mg/kg i.p.) oder LPS+1400W (5 mg/kg i.p.) wurde die Plasmanitritkonzentration im Griess Assay ermittelt. Die Vorbehandlung mit LPS steigerte die Plasmanitritkonzentration zu beiden Messzeitpunkten signifikant. Die Applikation des iNOS-Inhibitors 1400W verhinderte diesen Anstieg zum Zeitpunkt 8 Stunden nach Vorbehandlung hingegen wieder signifikant. Weitere 8 Stunden später, also insgesamt 16 Stunden nach Präkonditionierung war dieser Effekt nur noch tendenziell nachweisbar (MW±SEM; n=5-6/Gruppe; * p<0,05 NaCl vs. LPS für 8 und 16 Stunden; # p<0,05 LPS vs. LPS+1400W für 8 Stunden).

3.2 Endotoxintoleranz (ET)

3.2.1 Kreislaufparameter und Sterblichkeit im Rahmen der Endotoxintoleranz

Der arterielle Mitteldruck (MAD) der behandelten Tiere wurde in einem 6-stündigen Zeitraum nach Stimulation mit hochdosiertem LPS (6 mg/kg i.v.) über einen in der Arteria carotis platzierten Katheter überwacht und aufgezeichnet (Abb. 5).

Als Kontrolle diente eine *Sham*-Gruppe, die instrumentiert wurde und zweimalig NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.; 1 ml/kg i.v.) erhielt. Diese Gruppe zeigte im gesamten Zeitverlauf normale Kreislaufparameter (Herzfrequenz nicht dargestellt).

Die Applikation von hochdosiertem LPS nach NaCl-Vorbehandlung führte hingegen zu einem signifikanten und raschen Abfall des MAD, der sich kurz erholte und ab dem Zeitpunkt 3 Stunden nach Stimulation bis zur Beendigung des Versuches signifikant erniedrigt blieb. Diese schwere, systemische Kreislaufdepression war in den Tieren, die 24 Stunden vorher mit niedrigdosiertem LPS (1 mg/kg i.p.) vorbehandelt worden waren, nicht zu beobachten. Hier war im Vergleich zur *Sham*-Gruppe kein signifikanter Unterschied im MAD nachweisbar.

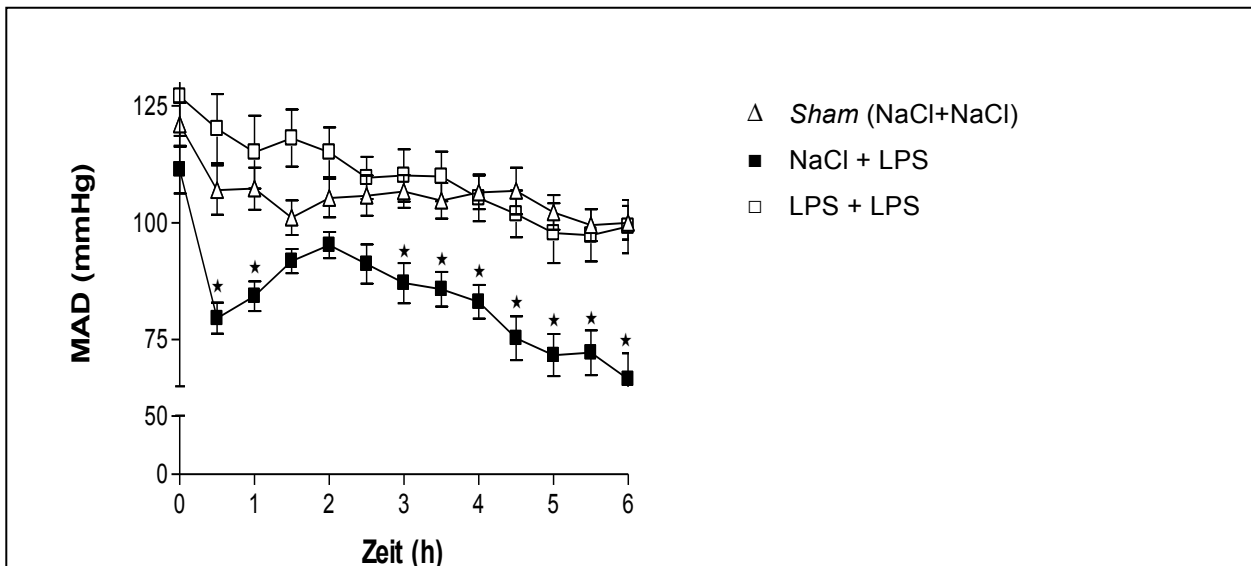


Abbildung 13: Arterieller Mitteldruck im Modell der Endotoxintoleranz

Im Vergleich zur *Sham*-Gruppe führte die Stimulation mit LPS nach 0,5 – 1 Stunde zu einem signifikanten Blutdruckabfall, der sich nur kurzfristig wieder erholte. Nach 3 Stunden blieb der arterielle Mitteldruck (MAD) signifikant niedriger. Die Vorbehandlung mit LPS verhinderte hingegen diesen signifikanten Abfall des MAD (MW±SEM; n=6/Gruppe; *p<0.05 LPS vs. entsprechender Zeitpunkt *Sham*-Gruppe).

Keines der Tiere starb durch die Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS (1 mg/kg i.p.). Die Ratten der *Sham*-Gruppe überlebten zu 100 % die Instrumentierung und Dauer des Versuches. 3 von 6 (50 %) Tieren, die hochdosiertes LPS (6 mg/kg i.v.) nach NaCl-Vorbehandlung erhalten hatten, starben innerhalb von 6 Stunden an den Folgen der systemischen Inflammation. Die Vorbehandlung mit der subletalen LPS-Dosis verbesserte das Überleben: Alle Tiere (100 %) der Endotoxintoleranz-Gruppe überlebten bis zur Beendigung der Untersuchung.

3.2.2 Lungenprotektion im Rahmen der Endotoxintoleranz

Um den Einfluss der LPS-Vorbehandlung (1 mg/kg i.p.) auf die inflammatorische Antwort in der Lunge angesichts eines potenziell tödlichen LPS-Stimulus zu untersuchen, wurden die pulmonale Myeloperoxidaseaktivität (MPO-Aktivität) und die *wet-to-dry ratio* (WTDR) der 6 Stunden nach Stimulation mit hochdosiertem LPS (6 mg/kg i.v.) entnommenen Lungen ermittelt. Als Kontroll-Gruppe dienten gänzlich unbehandelte Tiere.

Die Gabe der potenziell letalen Dosis LPS führte nach Vorbehandlung mit NaCl zu einer ausgeprägten Entzündungsantwort. Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe war ein signifikanter Anstieg der MPO-Aktivität als indirekter Marker für eine Immigration aktivierter PMN nachweisbar ($p < 0,05$). Auch die WTDR zeigte im Vergleich zu nicht-stimulierten Ratten 6 Stunden nach Stimulation signifikant höhere Lungengewichte ($p < 0,05$). Weiterhin führte die hochdosierte LPS-Gabe in den untersuchten Rattenlungen zu einem nachweisbaren, aber im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nicht-signifikanten Anstieg von pulmonalem HO-1-Protein.

Die Vorbehandlung mit einer nicht-letalen Dosis LPS 24 Stunden vor Verabreichung der hochdosierten LPS-Stimulation reduzierte den Lungenschaden signifikant. Sowohl die MPO-Aktivität als auch die WTDR waren im Vergleich zur LPS-Stimulation nach Vorbehandlung mit NaCl signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). Zeitgleich konnte in den Lungen der so vorbehandelten Tiere ein weiterer, jetzt signifikanter Anstieg der HO-1 Konzentration im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden.

Um eine mögliche Rolle der iNOS für die beobachteten Phänomene in der Endotoxintoleranz-Gruppe zu ergründen, wurde einer weiteren Gruppe neben der Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS auch der iNOS-Inhibitor 1400W appliziert (5 mg/kg i.p.). In

diesem Fall übte die Präkonditionierung nach Stimulation mit hochdosiertem LPS keinen pulmonal entzündungshemmenden Effekt aus: Sowohl die MPO-Aktivität als auch die WTDR waren signifikant höher als in der Endotoxintoleranz-Gruppe ($p < 0,05$) und annähernd so groß wie nach alleiniger Gabe von LPS in potenziell letaler Dosis. Dies ging mit einer signifikanten Reduktion des pulmonalen HO-1-Proteins im Vergleich zur Endotoxintoleranz-Gruppe einher.

Die gesteigerte Aktivität der iNOS führt bei einem inflammatorischen Reiz zu einer Induktion der HO-1. Um zu erfassen, ob die Endotoxintoleranz der Lunge möglicherweise durch die von der iNOS induzierte Erhöhung der HO-1-Konzentration bedingt ist, wurde den Ratten in einer weiteren Gruppe 18 Stunden nach LPS-Vorbehandlung der HO-1-Inhibitor Zink Protoporphyrin IX (SnPPIX 50 $\mu\text{mol/kg}$ i.p.) appliziert. Dies führte im Vergleich zu der Endotoxintoleranz-Gruppe zu einer ausgeprägten Inflammation, ablesbar an einem signifikanten Anstieg der pulmonalen MPO-Aktivität und der WTDR ($p < 0,05$). Interessanterweise war dieser Effekt nicht mit einer Veränderung der pulmonalen HO-1-Proteinmenge vergesellschaftet: Die HO-1 zeigte in dieser Gruppe ähnlich hohe Proteinspiegel wie in der Endotoxintoleranz-Gruppe. Deshalb wurde zusätzlich die Aktivität der HO-1 bestimmt. Selbige war nach SnPPIX-Gabe deutlich verringert (Daten nicht dargestellt, siehe Diskussion).

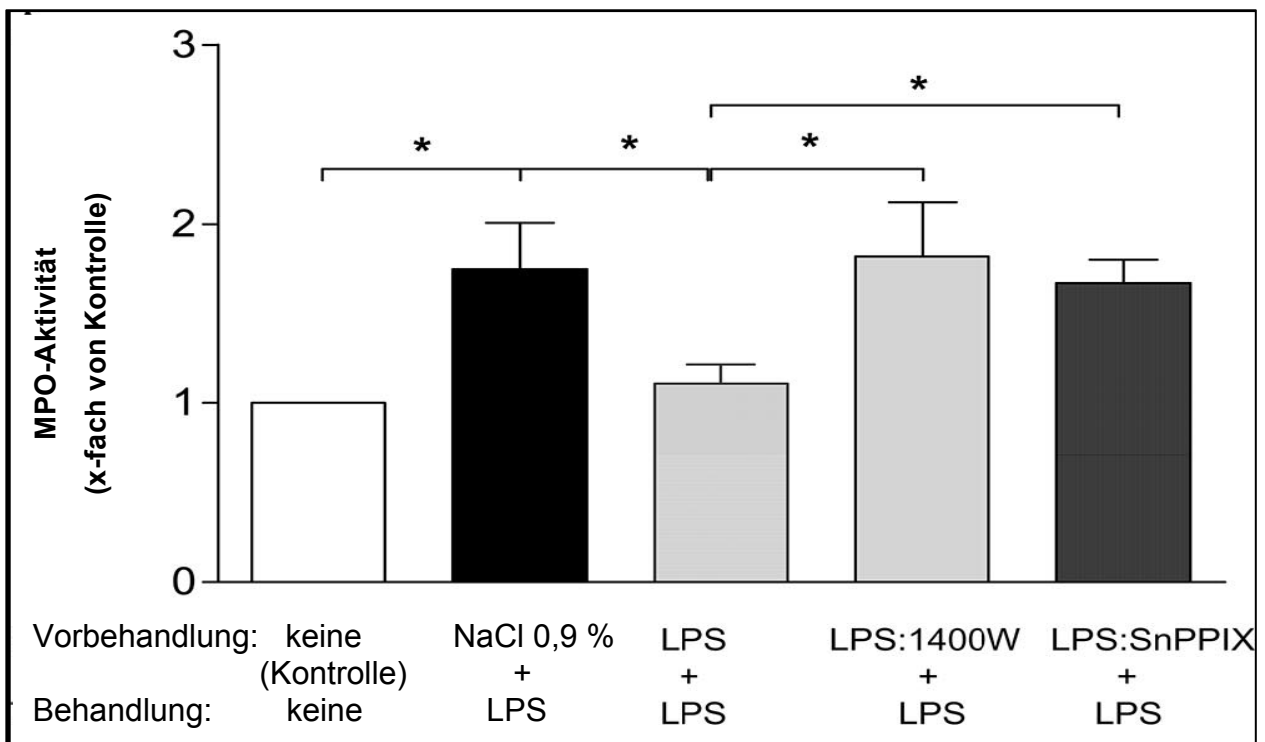


Abbildung 14: Pulmonale Myeloperoxidaseaktivität im Modell der Endotoxintoleranz. Versuchstiere wurden zunächst entweder mit NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.), nur mit niedrigdosiertem Lipopolysaccharid (LPS: 1 mg/kg i.p.), mit niedrigdosiertem LPS (1 mg/kg i.p.) und dem iNOS-Inhibitor 1400W (5 mg/kg i.p.) oder mit LPS (1 mg/kg i.p.) und 18 Stunden später mit dem HO-1-Inhibitor Zink Protoporphyrin IX (SnPPIX 50 µmol/kg i.p.) präkonditioniert. Nach 24 Stunden erfolgte die Stimulation mit hochdosiertem LPS (6 mg/kg i.v.) und weitere 6 Stunden später die Organentnahme. Kontroll-Tiere waren unbehandelt. Die Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS schwächte die entzündliche Reaktion in der Lunge, gemessen anhand der MPO-Aktivität, nach hochdosierter LPS Stimulation signifikant ab. Sowohl die Gabe des iNOS-Inhibitors 1400W als auch die Gabe des HO-1-Inhibitors SnPPIX hoben diese Lungenprotektion wieder vollständig auf. (MW±SEM, n=6/Gruppe; * p<0,05: Kontrolle vs. NaCl 0,9 %+LPS, NaCl 0,9 %+LPS vs. LPS+LPS, LPS+LPS vs. LPS:1400W+LPS, LPS+LPS vs. LPS:SnPPIX+LPS).

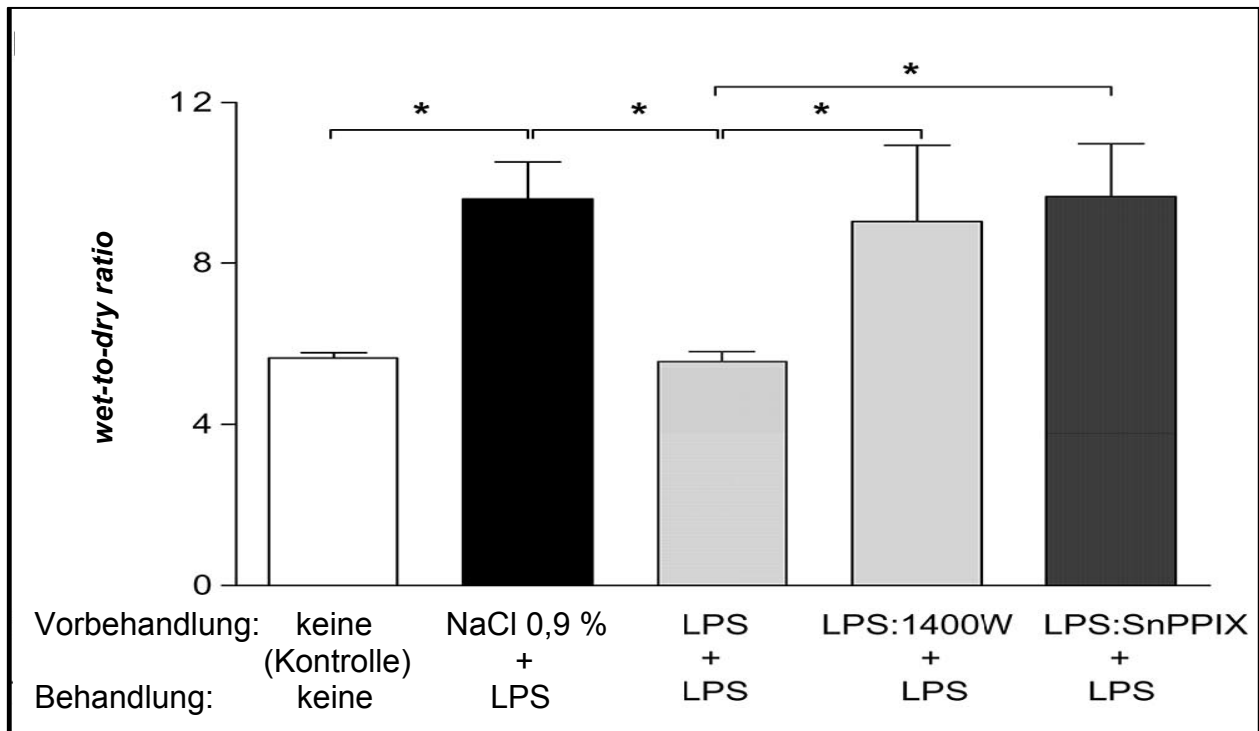


Abbildung 15: Pulmonale *wet-to-dry ratio* im Modell der Endotoxintoleranz

Die Tiere wurden zunächst entweder mit NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.), nur mit niedrigdosiertem Lipopolysaccharid (LPS: 1 mg/kg i.p.), mit niedrigdosiertem LPS (1 mg/kg i.p.) und dem iNOS-Inhibitor 1400W (5 mg/kg i.p.) oder mit LPS (1 mg/kg i.p.) und 18 Stunden später mit dem HO-1-Inhibitor Zink Protoporphyrin IX (SnPPIX 50 µmol/kg i.p.) vorbehandelt. Nach 24 Stunden erfolgte die Applikation von hochdosiertem LPS (6 mg/kg i.v.) und weitere 6 Stunden später dann die Organentnahme. Kontroll-Tiere erhielten keine Intervention. Die Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS attenuierte die entzündliche Reaktion der Rattenlunge, gemessen als WTDR, nach hochdosierter LPS-Stimulation signifikant. Die Gabe des iNOS-Inhibitors 1400W minderte diesen protektiven Effekt auf signifikantem Niveau. Auch die Gabe des HO-1-Inhibitors SnPPIX hob die Lungenprotektion vollständig auf. (MW±SEM, n=6/Gruppe; * p<0,05: Kontrolle vs. NaCl 0,9 %+LPS, NaCl 0,9 %+LPS vs. LPS+LPS, LPS+LPS vs. LPS:1400W+LPS, LPS+LPS vs. LPS:SnPPIX+LPS).

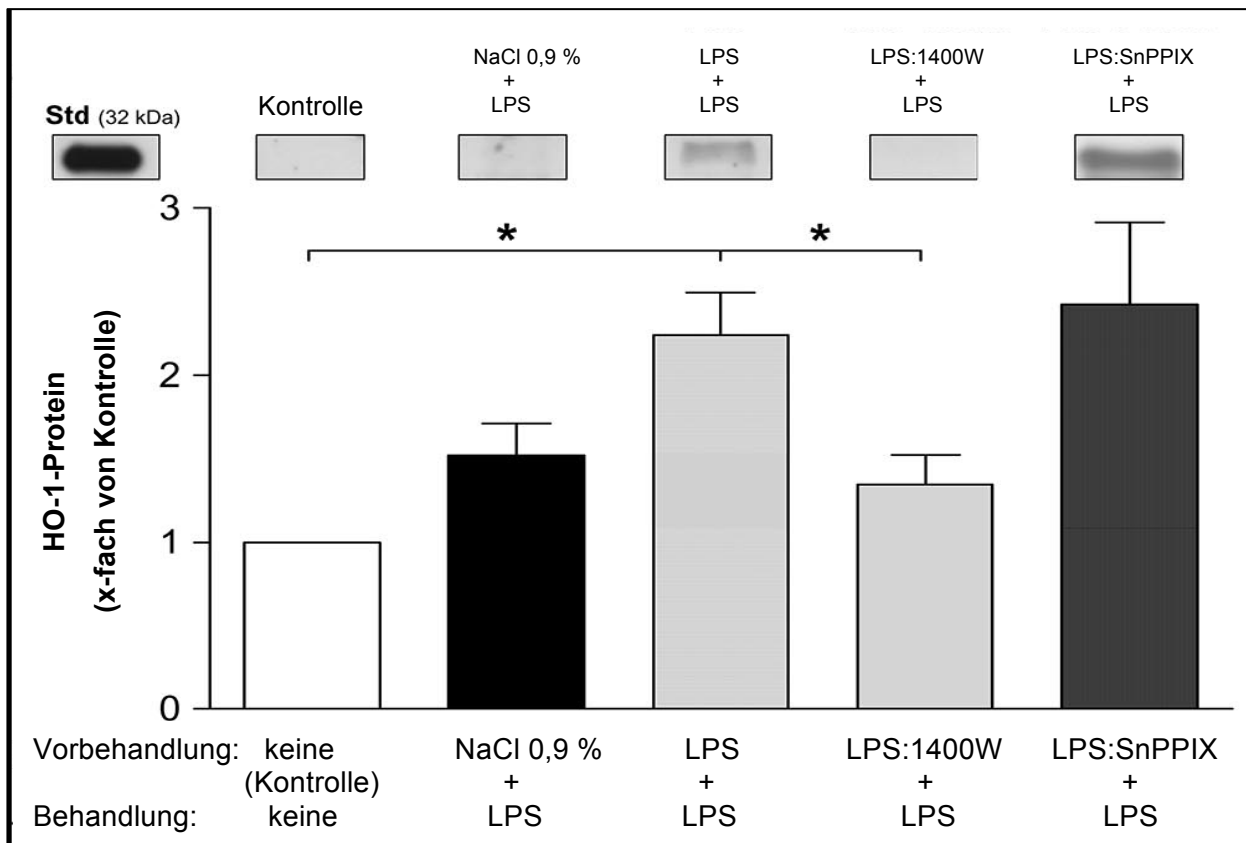


Abbildung 16: Pulmonale HO-1-Proteinmenge im Modell der Endotoxintoleranz

Die Ratten wurden zunächst entweder mit NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.), nur mit niedrigdosiertem Lipopolysaccharid (LPS: 1 mg/kg i.p.), mit LPS (1 mg/kg i.p.) und dem iNOS-Inhibitor 1400W (5 mg/kg i.p.) oder mit LPS (1 mg/kg i.p.) und 18 Stunden später mit dem HO-1-Inhibitor Zink Protoporphyrin IX (SnPPIX 50 µmol/kg i.p.) vorbehandelt. Nach 24 Stunden erfolgte die Stimulation mit einer potenziell tödlichen Dosis LPS (6 mg/kg i.v.) und weitere 6 Stunden später die Organentnahme. Kontroll-Tiere erhielten keine Intervention. Die Applikation von hochdosiertem LPS nach NaCl-Vorbehandlung induzierte die HO-1 in der Lunge nicht signifikant. Erfolgte jedoch eine Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS, so führte dies zu einem nun signifikanten Anstieg der pulmonalen HO-1 im Vergleich zu Kontroll-Tieren. Die Gabe des iNOS-Inhibitors 1400W reduzierte die Bildung der pulmonalen HO-1 auf signifikantem Niveau. Im Gegensatz dazu hatte die Gabe des HO-1-Inhibitors SnPPIX keinen signifikant attenuierenden Einfluss auf die pulmonale Proteinmenge. (MW±SEM, n=6/Gruppe; * p<0,05: Kontrolle vs. LPS+LPS, LPS+LPS vs. LPS:1400W+LPS).

3.3 Kreuztoleranz (KT)

3.3.1 Kreislaufparameter und Sterblichkeit im Rahmen der Kreuztoleranz

Nach simultaner Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA 3 mg/kg i.v.) und Peptidoglykan (PepG 10 mg/kg i.v.) wurde in einem Zeitraum von 6 Stunden der arterielle Mitteldruck (MAD) der behandelten Tiere über einen in der Arteria carotis platzierten Katheter überwacht und aufgezeichnet. Eine *Sham*-Gruppe, die instrumentiert wurde und zweimalig NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.; 1 ml/kg i.v.) erhielt, diente als Kontroll-Gruppe. Diese zeigte im gesamten Zeitverlauf normale Kreislaufparameter (Herzfrequenz nicht dargestellt).

Analog zu den Untersuchungen der Endotoxintoleranz führte die grampositive Stimulation zunächst (1-1,5 Stunden) zu einer signifikanten Reduktion des MAD in den Tieren, die hochdosiertes LTA und PepG nach NaCl-Vorbehandlung erhalten hatten ($p < 0,05$). Allerdings stabilisierte sich der MAD der Ratten nach dieser kurzen Hypotensionsphase rasch und blieb anschließend auf selbigem Niveau erhalten.

Interessanterweise verhinderte eine Präkonditionierung mit niedrigdosiertem LPS (1 mg/kg i.p.) 24 Stunden vor Stimulation den kurzzeitigen Blutdruckabfall, der in der Stimulations-Gruppe zu beobachten war. Signifikante Unterschiede zwischen der Stimulations- und der Kreuztoleranz-Gruppe waren aber nicht nachweisbar.

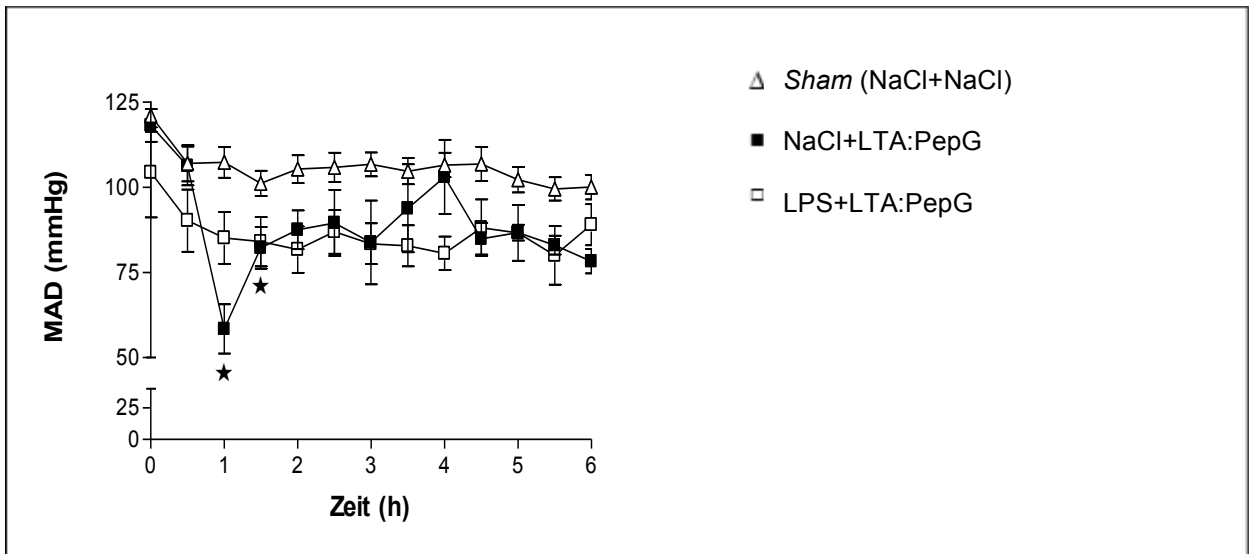


Abbildung 17: Arterieller Mitteldruck im Modell der Kreuztoleranz

Analog zu den Untersuchungen der Endotoxintoleranz führte die Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA: 6 mg/kg i.v.) und Peptidoglykan (PepG: 10 mg/kg i.v.) zunächst (1-1,5 Stunden) zu einer signifikanten Reduktion des arteriellen Mitteldruckes (MAD) in Tieren, die LTA und PepG nach NaCl-Vorbehandlung verabreicht bekommen hatten ($p < 0,05$). Dieser stabilisierte sich jedoch nach kurzer Hypotensionsphase rasch und blieb anschließend erhalten. Eine Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS (1 mg/kg i.p.) 24 Stunden vor grampositiver Stimulation verhinderte den kurzzeitigen Blutdruckabfall, der in der reinen Stimulations-Gruppe zu beobachten war. Weitere signifikante Unterschiede der MAD-Verläufe waren aber nicht nachweisbar (MW \pm SEM; $n=6$ /Gruppe; * $p < 0.05$ LTA:PepG vs. entsprechender Zeitpunkt Sham-Gruppe).

Die jeweilige Vorbehandlung führte bei keinem Versuchstier zum Tod. Sham-Ratten überlebten zu 100 % die Instrumentierung und die Dauer des Versuches. Nach Stimulation mit hochdosiertem LTA und PepG verstarben 2 von 6 Ratten (33 %) innerhalb von 6 Stunden. Die Sterblichkeit war hier also geringer als in der in Kapitel 3.2.1 dargestellten Gruppe nach LPS Stimulation (50 %). Wie auch bei den Versuchen zur Endotoxintoleranz führte die Vorbehandlung mit einer subletalen LPS-Dosis zum Überleben aller Tiere (100 %) angesichts eines nachgeschalteten, potenziell letalen Stimulus.

3.3.2 Lungenprotektion im Rahmen der Kreuztoleranz

Es sollte nun der Einfluss einer Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS auf die pulmonale Entzündungsantwort nach einem grampositiven, potenziell tödlichen Stimulus untersucht werden und somit detektiert werden, ob eine pulmonale Kreuztoleranz induziert werden konnte.

24 Stunden nach Applikation von einer subletalen Dosis von LPS (1 mg/kg i.p.), wurden Lipoteichonsäure (LTA 3 mg/kg i.v.) und Peptidoglykan (PepG 10 mg/kg i.v.) hochdosiert verabreicht und weitere 6 Stunden später die MPO-Aktivität und die WTDR als Marker einer pulmonalen Inflammation und Schädigung untersucht. Tiere der Kontroll-Gruppe erhielten keinerlei Intervention.

Die Applikation von hochdosiertem LTA und PepG nach NaCl-Vorbehandlung führte im Vergleich mit den Kontroll-Tieren zu einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion der Rattenlungen. Dies war an einer signifikanten Steigerung der MPO-Aktivität sowie an einer signifikanten Zunahme der Lungengewichte ablesbar (beide $p < 0,05$). Parallel hierzu konnte ein diskreter, aber nicht-signifikanter Anstieg der HO-1-Proteinmenge in der Lunge gemessen werden.

Die Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS reduzierte sowohl die MPO-Aktivität als auch die WTDR in der Lunge im Vergleich zu der Stimulation mit LTA und PepG nach NaCl-Vorbehandlung signifikant (beide $p < 0,05$), sodass von einer geringeren Lungenschädigung auszugehen ist. Der Proteinspiegel für die HO-1 war nun signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe.

Um einen Einfluss der iNOS auf das hier zu beobachtende Phänomen der pulmonalen Kreuztoleranz zu untersuchen, wurde einer weiteren Gruppe neben der Vorbehandlung mit LPS in nicht-letaler Dosis (1 mg/kg i.p.) zusätzlich der iNOS-Inhibitor 1400W (5 mg/kg i.p.) appliziert. Dies führte 6 Stunden nach hochdosierter LTA- und PepG-Stimulation im Vergleich zur Kreuztoleranz-Gruppe zu einer signifikant höheren MPO-Aktivität ($p < 0,05$). Die WTDR war, verglichen mit der Kreuztoleranz-Gruppe, nicht signifikant verändert.

Außerdem senkte die Inhibition der iNOS den pulmonalen HO-1-Proteinspiegel im Vergleich zur Kreuztoleranz-Gruppe auf signifikantem Niveau ($p < 0,05$).

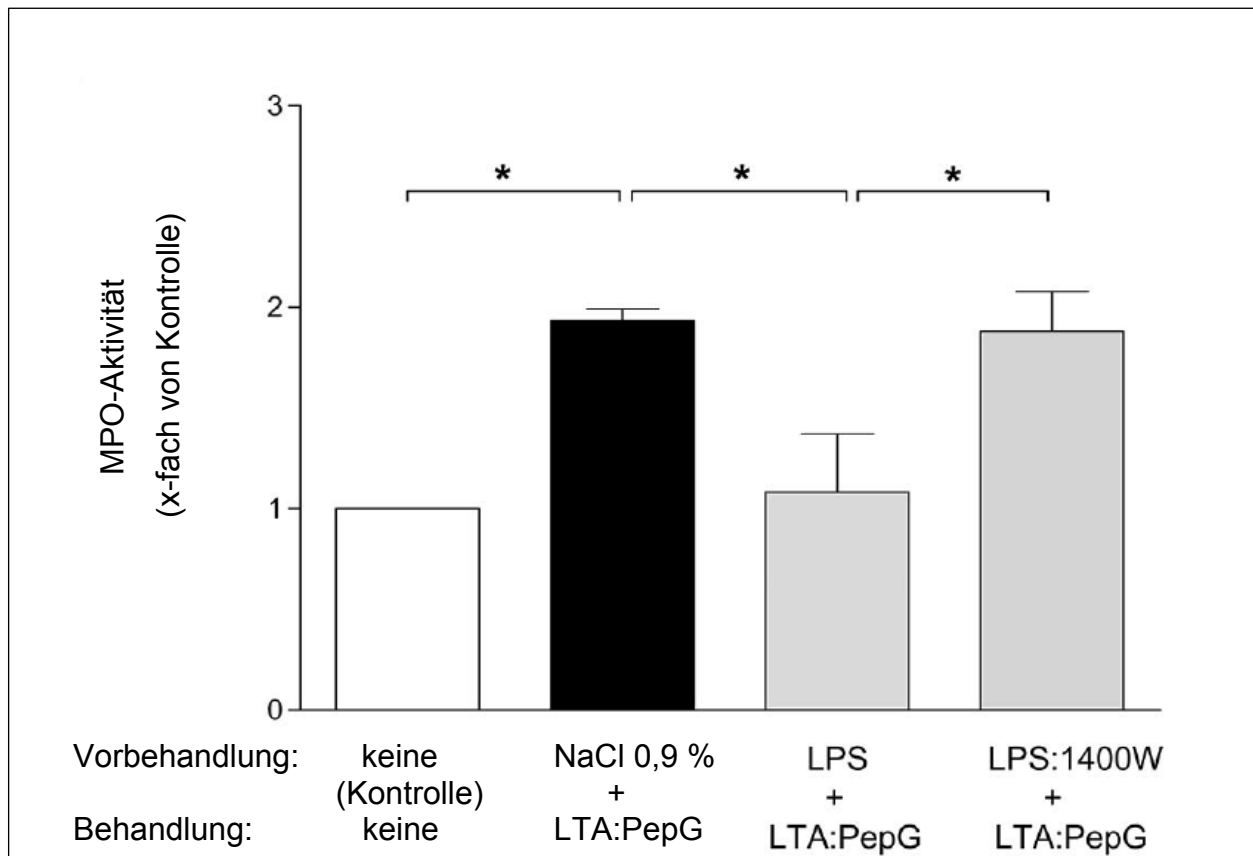


Abbildung 18: Pulmonale Myeloperoxidaseaktivität im Modell der Kreuztoleranz

Die Tiere wurden entweder zunächst mit NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.), nur mit niedrigdosiertem LPS (LPS: 1 mg/kg i.p.) oder mit niedrigdosiertem LPS und dem iNOS-Inhibitor 1400W (5 mg/kg i.p.) vorbehandelt. Nach 24 Stunden erfolgte die Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA: 3 mg/kg i.v.) und Peptidoglykan (PepG: 10 mg/kg i.v.) und weitere 6 Stunden später die Organentnahme. Kontroll-Tiere erhielten keine Intervention. Die Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS schwächte die entzündliche Reaktion in der Lunge gemessen über die MPO-Aktivität nach potenziell letaler LTA:PepG-Stimulation im Vergleich zu Ratten, die NaCl zur Vorbehandlung erhalten hatten und dann stimuliert wurden, signifikant ab. Die Gabe des iNOS-Inhibitors 1400W hob diesen protektiven Effekt wieder auf (MW±SEM, n=6/Gruppe; * p<0,05: Kontrolle vs. NaCl 0,9 % + LTA:PepG, NaCl 0,9% + LTA:PepG vs. LPS + LTA:PepG, LPS + LTA:PepG vs. LPS:1400W + LTA:PepG).

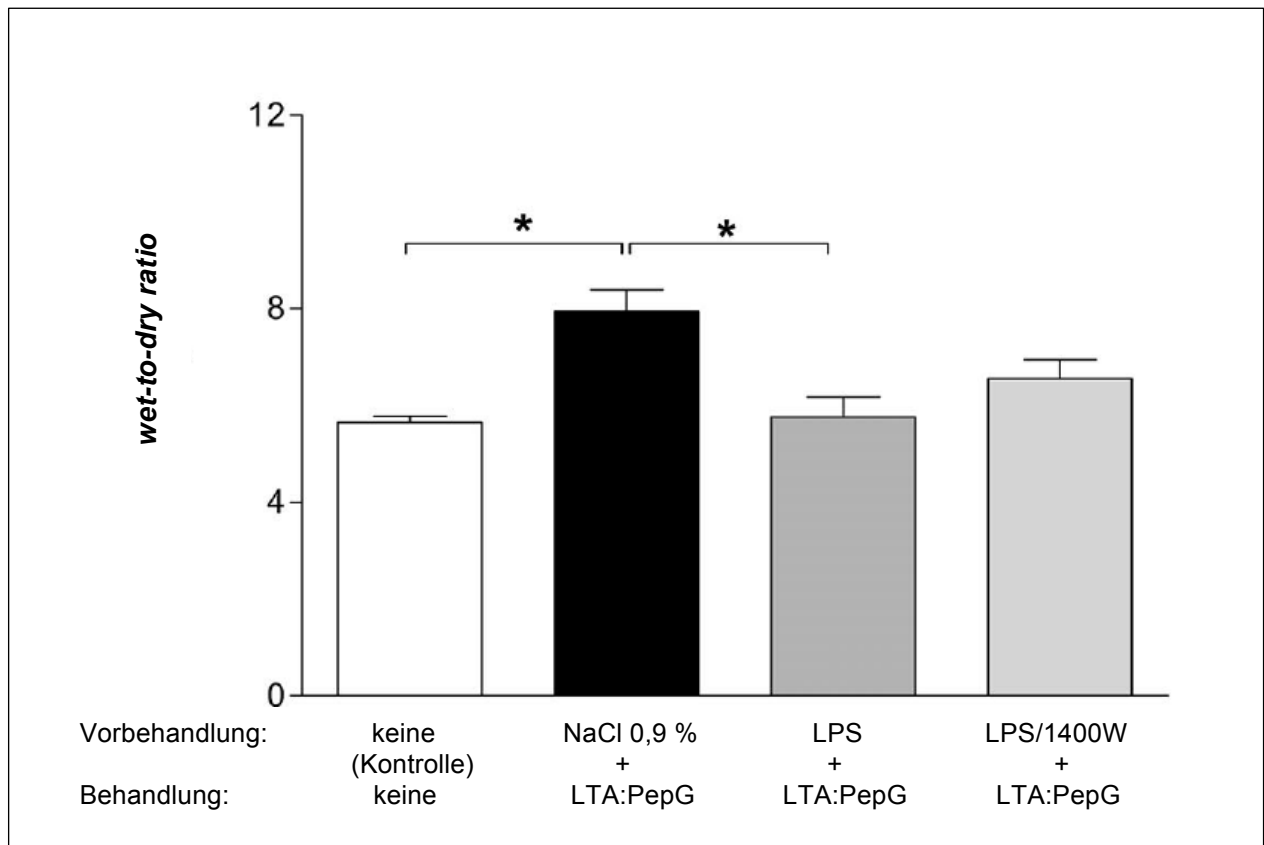


Abbildung 19: Pulmonale *wet-to-dry ratio* im Modell der Kreuztoleranz

Versuchstiere wurden entweder mit NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.), niedrigdosiertem Lipopolysaccharid (LPS: 1 mg/kg i.p.) oder mit niedrigdosiertem LPS (1 mg/kg i.p.) und dem iNOS-Inhibitor 1400W (5 mg/kg i.p.) präkonditioniert. Nach 24 Stunden erfolgte die hochdosierte Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA: 3 mg/kg i.v.) und Peptidoglykan (PepG: 10 mg/kg i.v.) und 6 Stunden später die Organentnahme. Kontroll-Tiere erhielten keine Intervention. Die Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS verminderte die Inflammation der Rattenlunge gemessen als *wet-to-dry ratio* (WTDR) nach LTA:PepG-Stimulation im Vergleich zu der NaCl+LPS-Gruppe auf signifikantem Niveau. Die Gabe des iNOS-Inhibitors 1400W attenuierte diesen protektiven Effekt tendenziell, jedoch nicht signifikant (MW±SEM, n=6/Gruppe; * p<0,05: Kontrolle vs. NaCl 0,9 % + LTA:PepG, NaCl 0,9 % + LTA:PepG vs. LPS + LTA:PepG).

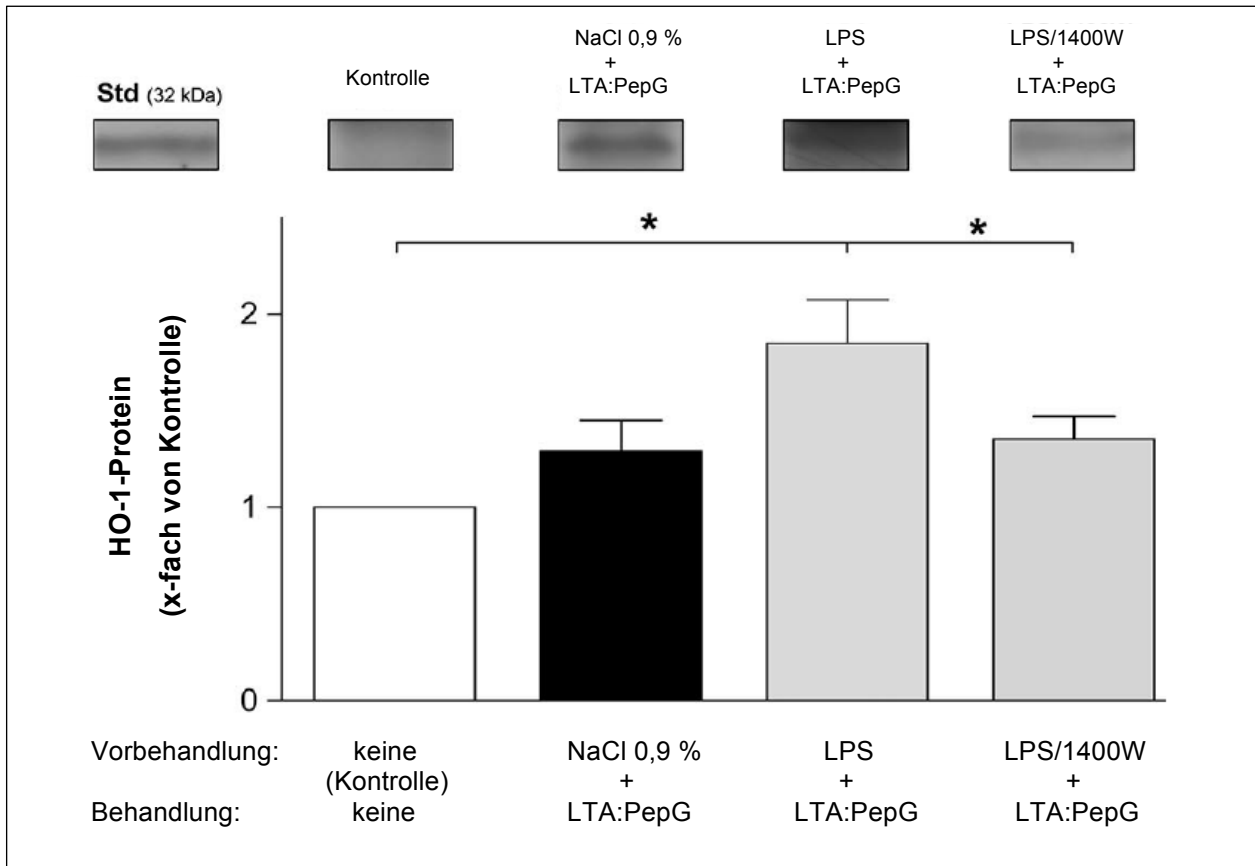


Abbildung 20: Pulmonale HO-1-Proteinmenge im Modell der Kreuztoleranz

Die Ratten wurden entweder zunächst mit NaCl 0,9 % (1 ml/kg i.p.), mit niedrig-dosiertem Lipopolysaccharid (LPS: 1 mg/kg i.p.) oder mit LPS (1 mg/kg i.p.) und dem iNOS-Inhibitor 1400W (5 mg/kg i.p.) vorbehandelt. Nach 24 Stunden folgte die hochdosierte Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA: 3 mg/kg i.v.) und Peptidoglykan (PepG: 10 mg/kg i.v.) und weitere 6 Stunden später dann die Organentnahme. Kontroll-Tiere waren unbehandelt. Die Stimulation mit einer potenziell tödlichen Dosis LTA:PepG induzierte die HO-1 nach NaCl-Präkonditionierung nicht signifikant. Eine Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS erhöhte die pulmonale HO-1-Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle jedoch auf signifikantem Niveau. Die Gabe des iNOS-Inhibitors 1400W verminderte die Bildung der anti-inflammatorischen HO-1 im Vergleich zur Kreuztoleranz-Gruppe dann wieder signifikant (MW±SEM, n=6/Gruppe; * p<0,05: Sham vs LPS + LTA:PepG; LPS + LTA:PepG vs. LPS:1400W + LTA:PepG).

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Präkonditionierung mit LPS in einer nicht-letalen Dosis von 1 mg/kg i.p. schützte die Tiere somit vor den Folgen einer nachgeschalteten Stimulation mit hochdosiertem LPS (Endotoxintoleranz) oder hochdosiertem LTA und PepG (Kreuztoleranz). LPS-vorbehandelte Tiere waren kreislaufstabiler und zeigten ein besseres Überleben. Auch die anhand der MPO-Aktivität und der WTDR gemessene, pulmonale Inflammation war geringer ausgeprägt. Sowohl die Applikation des iNOS-Inhibitors 1400W zum Zeitpunkt der LPS-Vorbehandlung als auch die Gabe des HO-1-Inhibitors SnPPIX 18 Stunden nach LPS-Präkonditionierung waren in der Lage, die pulmonale Protektion im Rahmen einer Endotoxintoleranz abzuschwächen. Auch die Kreuztoleranzentwicklung wurde durch die zeitgleiche Verabreichung von LPS und 1400W abgeschwächt. Hier zeigte allerdings nur die MPO-Aktivität eine signifikante Zunahme der Lungenschädigung im Vergleich zu der Kreuztoleranz-Gruppe. Sämtliche Toleranzentwicklungen gingen mit einer iNOS-induzierten Erhöhung der HO-1-Proteinmenge einher. Dieser Effekt wurde durch die Inhibition der iNOS aufgehoben.

4. Diskussion

Die hier vorgelegte Arbeit war Teil von Untersuchungen zur LPS-induzierten Lungenprotektion in einem *in vivo* Modell der Ratte. Es wurde gezeigt, dass eine Vorbehandlung mit hochgereinigtem Lipopolysaccharid (LPS), einem Wandbestandteil gramnegativer Bakterien, die Lunge vor den Folgen eines nachgeschalteten, potenziell tödlichen, gramnegativen Stimulus schützt (Endotoxintoleranz). Außerdem konnte erstmalig demonstriert werden, dass der Lungenschaden auch nach einem konsekutiven, grampositiven Stimulus durch Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykan (PepG) nach einer LPS-Präkonditionierung abgemildert ist (Kreuztoleranz). Für beide Toleranzentwicklungen der Rattenlunge wurde die iNOS-abhängige Induktion des anti-inflammatorischen Proteins HO-1 als möglicher gemeinsamer, zugrundeliegender Mechanismus herausgearbeitet.

Der Kontakt eines Wirtes mit LPS induziert eine veränderte Proteinbiosynthese von inflammatorischen und anti-inflammatorischen Mediatoren (Takeuchi und Akira, 2010). Als Konsequenz kann dosisabhängig eine systemische, Sepsis-artige Entzündungsreaktion auftreten, die kompensatorisch wiederum in eine Immunparalyse münden kann (Bone, 1996b; Cohen, 2002; Nathan, 2002). Während dieser Entzündungsreaktion kommt es häufig auch zu einer pulmonalen Schädigung (Matthay et al., 2012).

Zur Simulation septischer Krankheitsverläufe wurden in der Vergangenheit häufig nicht infektiöse, mono-virulente Sepsis-Modelle gewählt. Nach aktuellem Wissensstand sind solche Verfahren polymikrobiellen Versuchsaufbauten wie der *Cecal ligation and puncture* (CLP) oder der *Colon ascendens stent peritonitis* (CASP) in der Darstellung der individuellen, hochkomplizierten Abläufe während einer humanen Sepsis unterlegen. Diese Komplexität von entzündlichen Prozessen bringt allerdings auch mit sich, dass die Reproduzierbarkeit einzelner Zeit- und Krankheitsverläufe in Modellen mit lebenden Bakterien nur bedingt gegeben ist. So lassen sich in CLP und CASP Versuchen immer wieder starke, interindividuelle Schwankungen der inflammatorischen Kaskade feststellen (Dyson und Singer, 2009; Matute-Bello et al., 2008; Poli-de-Figueiredo et al., 2008).

Da eine verlässliche Reproduzierbarkeit und eine hohe Standardisierbarkeit für mechanistische Fragestellungen von existenzieller Bedeutung sind, wurde für die Untersuchung der vorliegenden Problematik, trotz seiner Limitierungen, auf das nicht-

infektiöse, mono-virulente Sepsis-Modell zurückgegriffen. Weiterhin bietet dieser Versuchsaufbau ideale Voraussetzungen, um *in vitro* erhaltene Ergebnisse zu Rezeptor-Liganden Interaktionen auch erstmals *in vivo* zu überprüfen. Als Versuchstiere wurden männliche Wistar Ratten gewählt. Sowohl in den Endotoxintoleranz- als auch in den Kreuztoleranzversuchen gelang die Auslösung eines septischen Krankheitsbildes durch die Gabe von hochdosiertem LPS (6 mg/kg i.v.) bzw. LTA (3 mg/kg i.v.) und PepG (10 mg/kg i.v.) problemlos. In beiden Fällen war eine sich rasch ausprägende Hypotension zu erkennen. Nach kurzer Erholung des arteriellen Mitteldruckes (MAD) folgte in den mit LPS stimulierten Tieren eine sukzessiv fortschreitende Kreislaufdepression (Abb. 13). Ähnliche Abläufe konnten auch in anderen Tiermodellen der Arbeitsgruppe beobachtet werden (Baumgarten et al., 2006a; Baumgarten et al., 2006b; Ehrentraut et al., 2011; Ehrentraut et al., 2007).

Interessanterweise führte die Verabreichung eines grampositiven Stimulus in Form von LTA und PepG zu einer vergleichsweise geringeren Kreislaufdepression und Letalität. Vergleichbare Resultate hatten Boehm et al. *in vivo* im Mausmodell erarbeitet. Zwar löste die Gabe von LTA auch bei ihnen eine systemische und kardiale Inflammation aus, allerdings war dieser Effekt auch in hohen LTA Dosierungen (bis zu 30 mg/kg i.p.) nur gering ausgeprägt. Weiterhin hatte LTA in ihren Versuchen sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* keinen funktionellen Einfluss auf die Herzfunktion (Boehm et al., 2013). Der MAD ist neben der Herzfunktion auch von dem peripheren Gefäßwiderstand abhängig. Ehrentraut et al. (2012) erarbeiteten diesbezüglich, dass das Fehlen des Rezeptors für LTA, TLR2, die Kontraktilität von isolierten Aortenringen angesichts eines polymikrobiellen Stimulus nur in geringem Ausmaß verbessert.

Insgesamt unterstreichen diese Daten, dass die Kreislauffunktion selbst bei einer Ko-stimulation mit zwei PAMP aus dem grampositiven Spektrum im Vergleich zu einer Stimulation mit LPS deutlich besser erhalten bleibt.

Auch in der Lunge induziert LTA allein nur eine gering ausgeprägte Inflammation: Ehrentraut et al. (2011) konnten *in vivo* in der Maus zeigen, dass bei systemischer Administration unterschiedlicher TLR-Liganden zwischen LPS und LTA in äquipotenten Dosierungen ein erheblicher Unterschied in der relativen Virulenz besteht. Bei ihnen induzierte die LTA-Gabe die geringste Menge von inflammatorischen Mediatoren und war nur mit einer milden Progression eines *Remodellings* der Mäuselunge vergesell-

schaftet. Die Verabreichung von LPS löste hingegen eine massive pulmonale Entzündungsreaktion aus und führte zu einem ausgeprägten Umbau des umliegenden Gewebes. Eine Ursache für die hier gemachte Beobachtung könnte sein, dass die im Mund- bzw. Nasen-/Rachenraum ubiquitär vorkommenden, grampositiven Bakterien häufig inhaliert werden. Um in diesem Szenario eine kontinuierliche, autodestruktive Inflammation zu verhindern, ist es somit notwendig, dass die Immunantwort der Lunge gegenüber grampositiven Keimen streng kontrolliert wird. Da gramnegative Erreger im Normalfall kein physiologischer Bestandteil der oberen Atemwege sind, führt eine Infektion mit diesen Bakterien hingegen schnell zu einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion.

In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Modellen konnte gezeigt werden, dass man durch die vorgeschaltete Verabreichung eines nicht-letalen LPS-Stimulus vor potenziell tödlichen Organschädigungen schützen kann. So führte die LPS-Vorbehandlung zu einer Protektion von Leber (Colletti et al., 1994; Dominguez Fernandez et al., 2002; Flohe et al., 1999; Topp et al., 2008), Niere (Heemann et al., 2000), Gehirn (Chen et al., 2005) und Herz (Meng et al., 1996; Shames et al., 1998; Zacharowski et al., 1999). Dieses Phänomen wird als Endotoxintoleranz bezeichnet und konnte auch vor Anfertigung dieser Arbeit schon speziell für die Lunge demonstriert werden (Flohe et al., 1999; Qu et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Murphey et al. erweiterte das Wissen um die Toleranzentstehung, indem sie beobachteten, dass die Vorbehandlung mit einem PAMP mit einer besseren pulmonalen *Clearance* vitaler Erreger vergesellschaftet ist (Murphey et al., 2008a; 2008b; Varma et al., 2005). Auch in dieser Arbeit war die Auslösung einer Lungenprotektion durch eine LPS-Vorbehandlung sowohl bei einem nachgeschalteten gramnegativen als auch bei einem grampositiven Stimulus möglich.

Die Erkenntnis, dass die eingesetzten PAMP hierbei TLR-abhängig eine inflammatorische Antwort induzieren (Takeuchi und Akira, 2010), führte zu einem ersten mechanistischen Erklärungsansatz für dieses Phänomen: Nomura et al. (2000) postulierten *in vitro* zunächst eine TLR4-Herabregulation als Ursache für die beobachtete Endotoxintoleranz. Folgearbeiten von Medvedev et al. (2001; 2003) konnten diese Theorie jedoch nicht vollständig nachvollziehen, da eine Toleranzinduktion in ihren Händen auch in TLR2- oder TLR4-überexprimierenden Zellen gelang. Somit kann eine alleinige Rezeptorherabregulation die Toleranzentstehung nicht vollständig erklären. Auch die in

dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass die Vorbehandlung mit einem TLR4-Agonisten vor einem nachfolgenden TLR2- und NOD-vermittelten Stimulus schützt, also eine Kreuztoleranz auslösbar ist, spricht gegen die Theorie einer Desensibilisierung oder Herabregulation der TLR als einzigen Mechanismus der Toleranzentwicklung.

Ältere Arbeiten zur Induktion einer Kreuztoleranz müssen in diesem Zusammenhang kritisch bewertet werden. Dieses Phänomen konnte zwar schon früh *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden (Dobrovolskaia et al., 2003; Jacinto et al., 2002; Lehner et al., 2001), allerdings waren die gemachten Beobachtungen häufig die Folge einer Verunreinigung der kommerziell erhältlichen LPS-Präparationen mit TLR2-Agonisten (Hirschfeld et al., 2000; Lee et al., 2002). Umgekehrt hat die Kontamination von vermeintlich reinem LTA mit LPS ebenfalls zu zahlreichen Fehlinterpretationen der Wirkung von LTA geführt (Morath et al., 2002). Somit ist gerade für Untersuchungen zur Kreuztoleranz die Reinheit der verwendeten PAMP zwingend erforderlich. Ansonsten können keine Aussagen über eine Rezeptor-übergreifende Pathophysiologie der Protektion getroffen werden.

Aus diesem Grund wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Substanzen mit anerkannten Methoden auf ihre Reinheit überprüft, sodass Kontaminationen im Vorfeld der Toleranzversuche vollständig ausgeschlossen waren. Zur Kontrolle der LPS-Präparation wurde ein TLR-spezifischer *NF- κ B reporter gene assay* angefertigt. Er zeigte, dass das verwendete LPS frei von TLR2-Agonisten war. Weiterhin konnten in einer Gelelektrophorese und einer enzymatischen Verdauung keinerlei Verunreinigungen des PepG mit anderen PAMP nachgewiesen werden. Die Reinheit des verwendeten LTA war bereits im Vorfeld dieser Versuchsreihe, wie zuvor in Lehner et al. (2001) und Morath et al. (2002) beschrieben, mit Hilfe eines *Limulus Amebocyte Assay* bestätigt worden.

Die in dieser Arbeit genutzte, synergistische pro-inflammatorische Wirkung von LTA und PepG wurde ursprünglich einer gemeinsamen Wirkung über den TLR2 zugesprochen (De Kimpe et al., 1995; Schwandner et al., 1999; Thiernemann, 2002). Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass die Wirkung von PepG und seiner Subkomponente Muramyl Dipeptid (MDP) ausschließlich über NOD-Rezeptoren vermittelt wird (Girardin et al., 2003; Kim et al., 2008; Travassos et al., 2004).

Somit bestätigte die hier vorgelegte Arbeit zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung erstmals unter Verwendung von nachweislich reinen PAMP, dass die durch die TLR4-spezifische Vorbehandlung induzierte Protektion der Lunge vor einem nachgeschal-

teten, über TLR2- und NOD-vermittelten Stimulus, nicht allein durch eine Rezeptor-desensibilisierung oder -herabregulation des TLR4 zu erklären ist. Folglich müssen der Entstehung einer Kreuztoleranz noch bedeutend kompliziertere und vielschichtigere Mechanismen zugrunde liegen als bisher vermutet.

So wird die Genese dieser Toleranzmechanismen nach heutigem Stand der Wissenschaft als ein individuell hochkomplexes, dynamisches und multifaktorielles Geschehen angesehen. Neben der negativen Regulation der TLR-vermittelten Signaltransduktionskaskade sowie der vermehrten Ausschüttung anti-inflammatorischer Proteine werden auch direkt zytoprotektive Mechanismen diskutiert (Biswas und Lopez-Collazo, 2009; Cavailon und Adib-Conquy, 2006; West und Heagy, 2002; Xiong und Medvedev, 2011). In dieser Arbeit konnte eine signifikante Abnahme der pulmonalen MPO-Aktivität sowohl im Modell der Endotoxintoleranz als auch in dem der Kreuztoleranz beobachtet werden (Abb. 14, 18). Der MPO-Aktivitätsassay ist ein häufig verwendetes und gut etabliertes Verfahren, mit dessen Hilfe die Aktivität von Neutrophilen Granulozyten (PMN) indirekt gemessen werden kann (Pheng et al., 1995; Razavi et al., 2004; Speyer et al., 2003; Zemans et al., 2009).

Das ausschließlich in PMN vorhandene lysosomale Enzym Myeloperoxidase (MPO) ist maßgeblich an der Infektabwehr und an der Genese des hierbei möglicherweise entstehenden Wirt-Zellschadens beteiligt (Klebanoff, 2005). Anhand der im Gewebe gemessenen MPO-Aktivität können damit Rückschlüsse auf die Menge aktivierter PMN gezogen werden. Außerdem ist so auch eine Beurteilung des durch sie entstandenen Gewebeschadens möglich.

Auch speziell in der Pathogenese des akuten direkten und indirekten Lungenversagens spielen PMN eine Schlüsselrolle. Die von ihnen sezernierten, antimikrobiellen Substanzen wirken nicht nur bakterizid, sondern gleichzeitig auch hochgradig zytotoxisch (Abraham, 2003; Brown et al., 2006; Iyer und Cheng, 2012; Singh et al., 2012; Wizemann und Laskin, 1994). Shelton et al. (2007) gelang der Nachweis, dass eingewanderte PMN für die Genese des ARDS-typischen Lungenödems sogar verantwortlich sind. Hierbei führen die im Rahmen einer systemischen oder auch lokalen Inflammation freigesetzten Zytokine zur Endotheladhäsion und schließlich zum Austritt der PMN in das Interstitium und den Alveolarraum der Lunge (Doerschuk, 2000; Ley et al., 2007; Reutershan et al., 2005; Zemans et al., 2009). Die von ihnen daraufhin

freigesetzten Chemokine verstärken wiederum den Neutrophileninflux und potenzieren so die initiale Antwort.

So konnte beim ARDS des Menschen beispielsweise gezeigt werden, dass die chemotaktische Aktivität in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von betroffenen Patienten im Vergleich zu lungengesunden Patienten deutlich erhöht ist (Parsons et al., 1985) und sogar eine vorübergehende Leukopenie induzieren kann (Thommasen et al., 1984). Wie gefährlich ein überschießender, pulmonaler PMN-Einstrom sein kann verdeutlichen außerdem Ergebnisse aus Tierversuchen (Abraham et al., 2000) und aus dem klinischen Kontext (Adams et al., 2001). Sie legen nahe, dass eine hohe Konzentration von PMN in der BAL direkt mit einem schlechteren Outcome während eines ARDS assoziiert ist.

Ein weiterer Marker für die Ausprägung der Lungenschädigung ist das, anhand der *wet-to-dry ratio* (WTDR) gemessene Ausmaß des induzierten Lungenödems. Auch die WTDR stellt ein einfaches und gut etabliertes Verfahren zur Quantifizierung eines Lungenschadens dar (Numata et al., 1998; Rudkowski et al., 2004). Die als Kapillarleck (*capillary leakage*) bezeichnete Permeabilitätszunahme des alveolären Epi- und Endothels resultiert in einem proteinreichen Exsudat und ist ein zentrales Kriterium des ARDS (Force et al., 2012). Die Genese dieser Schrankenstörung wird unter anderem einer durch Leukozytenmigration entstandenen, direkt mechanischen Schädigung der Gefäßbarriere zugeordnet (Bachofen und Weibel, 1977; Zemans et al., 2009). Darüber hinaus scheinen aber auch hier weitere inflammatorische Abläufe eine zentrale Rolle zu spielen (Dolinay et al., 2012).

In den hier vorgelegten Versuchen führte die Induktion einer systemischen Inflammation mit hochdosiertem LPS oder LTA:PepG zu einer signifikanten Zunahme der Lungengewichte, ablesbar an der erhöhten WTDR. Die Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS hingegen reduzierte die WTDR als Maß des induzierten Lungenschadens signifikant (Abb. 15, 19). Somit kann in den Modellen der Endotoxin- und der Kreuztoleranz von einer Protektion der Gefäßbarriere ausgegangen werden.

Das von der iNOS synthetisierte und freigesetzte NO spielt im Rahmen systemisch inflammatorischer Prozesse eine entscheidende Rolle (Thiemermann, 1997). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass bereits die Gabe einer nicht-letalen Dosis LPS (1 mg/kg i.p.) zu einer im Zeitverlauf und im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikant

erhöhten pulmonalen Proteinmenge von iNOS führte (Daten nicht Teil dieser Dissertation; Koch et al., 2007).

Nach heutigem Wissensstand ist die Wirkung der iNOS auf den Verlauf inflammatorischer Prozesse von einer Reihe von Faktoren abhängig. Viele Schockversuche mit iNOS-Knockout-Mäusen oder iNOS-Inhibitoren wiesen zunächst auf einen rein schädigenden Charakter der iNOS Induktion hin (Kristof et al., 1998; Numata et al., 1998; Wang et al., 2002). Auch in der Lunge wurde die erhöhte iNOS-Expression in alveolären Makrophagen und eingewanderten PMN und die daraus resultierende, erhöhte NO-Konzentration für die Entstehung eines ARDS verantwortlich gemacht. Dies vermutete man sowohl im Tiermodell (Haddad et al., 1994; Wizemann et al., 1994) als auch im klinischen Alltag (Haddad et al., 1994; Kooy et al., 1995). Andere Untersuchungen konnten einen schädigenden Effekt einer iNOS Induktion jedoch nicht bestätigen. So führte die iNOS-Inhibition und die Verwendung von iNOS-Knockout-Mäusen in Schock- (Pheng et al., 1995; Rudkowski et al., 2004) und Toleranzversuchen (Dias et al., 2005; Soszynski, 2002) zu einem schlechteren Überleben der Versuchstiere.

Eine Begründung für diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse könnte darin bestehen, dass NO im Rahmen inflammatorischer Prozesse zeit-, konzentrations- und lokalisationsabhängig sowohl schützende als auch schädigende Eigenschaften zu besitzen scheint. Shelton et al. konnten beispielsweise durch eine Versuchsreihe an knochenmarktransplantierten iNOS-Knockout-Mäusen zeigen, dass die iNOS aus alveolären Zellen für den Großteil des im Rahmen einer Inflammation anfallenden NOs verantwortlich ist. Interessanterweise stellten sie aber auch fest, dass lediglich das von eingewanderten PMN produzierte NO für das ARDS-typische Lungenödem und die Potenzierung des Neutrophileninfluxes verantwortlich gemacht werden kann (Shelton et al., 2007; Wang et al., 2002). Ergebnisse der Forschungsgruppe um Hickey et al. (2002) unterstützen diese Vermutung.

Weiterhin wird die beobachtete Protektion wahrscheinlich nicht allein durch NO, sondern auch durch nachgeschaltete, NO-induzierte Vorgänge vermittelt. So war zum Beispiel bereits vor Anfertigung dieser Versuchsreihe bekannt, dass das anti-inflammatorische und protektive Protein HO-1 iNOS-abhängig induziert werden kann (Chen und Maines, 2000; Hartsfield et al., 1997; Srisook und Cha, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb erstmalig der Einfluss einer NF κ B-abhängigen Induktion des Enzymsystems iNOS/HO-1 auf die Entstehung einer pulmonalen Protektion im Rahmen von Endotoxin- und Kreuztoleranz untersucht.

In Vorversuchen führte die Vorbehandlung mit niedrig-dosiertem LPS (1 mg/kg i.p.), ähnlich wie bei der iNOS-Expression, zu einem im Zeitverlauf signifikanten Anstieg des pulmonalen HO-1-Proteins (Daten nicht Teil dieser Dissertation; Koch et al 2007). Während die iNOS 8 Stunden nach LPS-Gabe ihre maximale Proteinmenge in der Lunge zeigte, gipfelte die HO-1-mRNA-Expression 8 Stunden später. Weitere 8 Stunden danach, d.h. 24 Stunden nach Vorbehandlung, erreichte die pulmonale HO-1-Proteinmenge ihr Maximum. Aus diesem Grund wurde für die Versuche zur Endotoxin- und Kreuztoleranz der Rattenlunge eine 24-stündige Vorbehandlungsdauer gewählt.

Die Gabe von hochdosiertem LPS (6 mg/kg i.v.) oder LTA:PepG (3 mg/kg;10 mg/kg i.v.) induzierte, wie anhand der Kreislaufparameter bereits erläutert, eine schwere systemische Inflammation. In dem hier gewählten Zeitfenster führte sie jedoch sowohl in den Versuchen zur Endotoxintoleranz als auch in den Versuchen zur Kreuztoleranz lediglich zu einem nicht-signifikanten Anstieg der pulmonalen HO-1. Wurden die Tiere allerdings mit niedrigdosiertem LPS (1 mg/kg i.p.) vorbehandelt, so konnte 6 Stunden nach Stimulation in beiden Modellen ein, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, signifikanter Anstieg des HO-1-Proteins in der Lunge gemessen werden (Abb. 16, 20). Die durch die Vorbehandlung bedingte Steigerung der HO-1-Konzentration war zu diesem Zeitpunkt mit einem, anhand der Reduktion der MPO-Aktivität und der WTDR ermittelten, verminderten Lungenschaden assoziiert.

Um die beobachtete Lungenprotektion auf eine iNOS-induzierte HO-1-Freisetzung zurückführen zu können, wurde das Schlüsselenzym iNOS in beiden Versuchsreihen zur Toleranzentwicklung spezifisch mit 1400W inhibiert. Zusätzlich erfolgte in den Versuchen zur Endotoxintoleranz der Einsatz des spezifischen HO-1-Inhibitors Zink Protoporphyrin IX (SnPPIX).

1400W ist bereits in zahlreichen Modellen erfolgreich als selektiver iNOS-Inhibitor genutzt worden (Garvey et al., 1997; Rudkowski et al., 2004). Aufgrund der, für die Aussagekraft dieser Versuchsreihe großen Wichtigkeit einer effektiven iNOS-Inhibition, wurde die Wirksamkeit des hier verwendeten 1400W trotz der bekannten Datenlage nochmals speziell für den Versuchsaufbau dieser Arbeit bestätigt. Hierzu erfolgte die

Untersuchung des entnommenen Blutplasmas zum Zeitpunkt der maximalen iNOS-Expression (8 und 16 Stunden nach LPS-Gabe) mit Hilfe des Griess Assays. Dieses Verfahren stellt eine sichere und preisgünstige Alternative zu teuren und aufwendigen, direkten NO-Bestimmungen mit Hilfe von Elektronenspinresonanz- und Sondenmessungen dar und findet deshalb in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten Verwendung (Green et al., 1982; Knowles und Moncada, 1994; Moshage et al., 1995; Qin et al., 2013).

In den hier präsentierten Interventionsversuchen führte die Gabe von 1400W im Modell der Endotoxintoleranz (Abb. 14, 15) zu einer kompletten Aufhebung der Lungenprotektion und zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Kreuztoleranz (Abb. 18, 19). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Versuchen von Dias et al. (2005), die die Entwicklung einer Endotoxintoleranz ebenfalls durch eine iNOS-Inhibition unterbrechen konnten. In ihrem Mausmodell führte dieses Vorgehen zur Aufhebung der Protektion in Form eines Wiederanstieges der Körpertemperatur. Im Widerspruch hierzu konnte die Arbeitsgruppe um Zingarelli et al. (2002) keine Abhängigkeit der Endotoxintoleranz von einer iNOS-Induktion feststellen. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der zeitabhängigen Expression der iNOS: Zingarelli et al. induzierten eine Toleranzentwicklung (*first hit*) durch LPS-Vorbehandlung mit 5 mg/kg i.p. und lösten 3 Tage später durch Gabe von 120 mg/kg i.p. bzw. 60 mg/kg i.p. LPS eine inflammatorische Antwort aus (*second hit*). Klassischerweise wird 8-16 Stunden nach LPS-Vorbehandlung ein einmaliger Gipfel des mit einer HWZ von nur 1,3-1,9 Stunden nur sehr kurzlebigen iNOS-Proteins erwartet. Danach sinkt die iNOS-Produktion stetig (Kolodziejcki et al., 2004; Kristof et al., 1998; Lin et al., 2006). Wird der *second hit* jedoch erst 72 Stunden nach dem *first hit* verabreicht, so ist der Einfluss von der iNOS auf die Toleranzentwicklung wahrscheinlich nicht mehr eindeutig nachzuvollziehen. Interessanterweise hatte dieselbe Arbeitsgruppe in einer früheren Arbeit durch den Einsatz geeigneterer Zeitfenster (24 Stunden) *in vivo* und *in vitro* gezeigt, dass die Toleranzentwicklung iNOS abhängig ist (Zingarelli et al., 1995).

Da die Applikation von 1400W in der Inhibitions-Gruppe außerdem zu einem signifikant reduzierten, pulmonalen HO-1-Proteinspiegel führte, ist der zeitlich-induktive Zusammenhang zwischen der iNOS-Aktivität und der konsekutiven, pulmonalen HO-1-Bildung für das hier etablierte Modell der Endotoxintoleranz bestätigt.

Zusätzlich wurde erstmals der Beweis erbracht, dass auch die Entstehung einer pulmonalen Kreuztoleranz in Abhängigkeit von iNOS auftritt. In Analogie zur Endotoxintoleranz führte der Einsatz von 1400W auch in der Kreuztoleranz-Gruppe zu einer signifikanten Senkung der HO-1-Expression in der Lunge. Die Aufhebung der Toleranzentwicklung ließ sich an einer signifikant höheren pulmonalen MPO-Aktivität ablesen (Abb. 14, 18). Die WTDR zeigte im Vergleich zu der Toleranz-Gruppe ebenfalls einen Trend zu einem höheren Lungengewicht, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Ein Grund hierfür könnte die bereits anhand der Kreislaufparameter diskutierte, geringere Virulenz des grampositiven Stimulus sein (Boehm et al., 2013; Ehrentraut et al., 2011). Dies könnte den Einfluss der Inhibition mit 1400W relativieren.

Um schließlich zu untersuchen, ob die HO-1 kausal an der beobachteten Endotoxintoleranz beteiligt ist, wurde ihre Aktivität durch die Gabe des spezifischen HO-1-Inhibitors SnPPIX moduliert. Wie bereits oben beschrieben, konnten Vorversuche zeigen, dass der Spitzenspiegel der HO-1 mRNA 16 Stunden nach Vorbehandlung erreicht wurde. Weitere 8 Stunden später gipfelte die HO-1-Proteinexpression. Nach Jozkowicz et al. (2003) sind Metalloporphyrine in der Lage die NOS Funktion dosisabhängig zu modulieren. Aus diesem Grund wurde SnPPIX nicht wie 1400W zusammen mit der LPS-Vorbehandlung gegeben, sondern erst 18 Stunden später. Zu diesem Zeitpunkt war die pulmonale iNOS-Proteinmenge bereits wieder abgefallen. Somit war ein Einfluss von SnPPIX auf die Rolle der iNOS in diesem Modell unwahrscheinlich.

Die Gabe von SnPPIX führte im Vergleich zur Endotoxintoleranz-Gruppe zu keiner Veränderung der pulmonalen HO-1-Proteinmenge. Andere Mitglieder der Arbeitsgruppe konnten in einem HO-1-Aktivitätsassay allerdings eine signifikante Abnahme der HO-1-Aktivität nach Einsatz von SnPPIX beobachten (Daten nicht Teil dieser Dissertation; Koch et al., 2007). Diese Ergebnisse decken sich mit Arbeiten von Carraway et al. (1998). Sie konnten für SnPPIX in einem Zeitintervall von 4-24 Stunden nach intratrachealer Verabreichung von LPS eine verlässliche Hemmung der HO-1-Aktivität ohne Abnahme der HO-1 Produktion nachweisen. Deshalb ist in der hier diskutierten Versuchsreihe, trotz gleichbleibender HO-1-Proteinmenge, von einer effektiven HO-1-Inhibition durch SnPPIX in dem für die HO-1-Expression relevanten Zeitfenster (22-30 Stunden nach LPS-Vorbehandlung) auszugehen. Die Hemmung der HO-1-Aktivität führte zu einer im Vergleich zur Toleranzgruppe signifikant erhöhten MPO-Aktivität und

WTDR (Abb. 14, 15) und beschreibt damit ein Ausbleiben der zuvor beobachteten Lungenprotektion. Folglich konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Entstehung einer Endotoxintoleranz der Rattenlunge von einer iNOS-induzierten Erhöhung der HO-1-Expression und -Aktivität abhängig ist.

Der Einsatz von SnPPIX im Modell der Kreuztoleranz war nicht Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit.

Wenige Arbeiten haben nach Veröffentlichung der hier vorgelegten Ergebnisse einen negativen Einfluss der HO-1 auf die Entstehung einer Endotoxintoleranz beschrieben. So postulierten Raffaini et al. (2006) und Piotrowski et al. (2014), dass die Applikation eines HO-1-Induktors die Toleranzentwicklung verhindere und zu einem ungünstigeren inflammatorischen Verlauf führe. Wesentliche Unterschiede zu dem hier demonstrierten Versuchsaufbau sind die verschiedenen Vorbehandlungs-Zeitpunkte (dreimal alle 24 Stunden) und die sehr niedrige Dosierung der LPS-Vorbehandlung (50 µg/kg i.p. vs. 1 mg/kg i.p.). Interessanterweise konnten West und Koons (2008) unlängst *in vitro* zeigen, dass verhältnismäßig geringe LPS-Dosierungen während der Vorbehandlung sogar zu einer verstärkten entzündlichen Antwort führen können. Dementsprechend könnten die niedrigen LPS-Vorbehandlungen von Raffaini et al. und Piotrowski et al. dazu geführt haben, dass statt einer Endotoxintoleranz eine verstärkte Sensibilität gegenüber einem *second hit* erzeugt wurde.

Auch wenn bisher keine weiteren Untersuchungen bezüglich der Rolle der HO-1 im Rahmen einer pulmonalen Endotoxin- und Kreuztoleranz publiziert worden sind, so konnte ihr lungenprotektiver Effekt bereits in verschiedensten anderen Modellen nachgewiesen werden (Ryter und Choi, 2009). Die Mechanismen, über die die HO-1 ihre schützenden Eigenschaften vermittelt, sind auch heute noch Gegenstand aktueller Forschungsanstrengungen: Konrad et al. (2014) führten den lungenprotektiven Effekt beispielsweise auf eine Inhibition der PMN-Freisetzung aus dem Knochenmark zurück. Sie konnten in einem Mausmodell zeigen, dass die Menge der nach Applikation von intratrachealem LPS aus dem Knochenmark freigesetzten PMN antiproportional zur Aktivität der in der Lunge exprimierten HO-1 ist. Auch in diesem Versuchsaufbau korrelierte das Ausmaß der Lungenschädigung mit der pulmonalen Immigration von PMN. Weitere Arbeiten sahen außerdem einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten HO-1-Aktivität und den anti-inflammatorischen Eigenschaften von IL-10.

Hierbei wurde HO-1 als zentraler Vermittler der schützenden Effekte von IL-10 im Rahmen eines septischen Schockes herausgestellt (Lee und Chau, 2002).

Zahlreiche Publikationen haben in der Vergangenheit anhand von *in vivo* und *in vitro* Versuchen vermutet, dass die protektiven Mechanismen im Rahmen von systemischen Inflammationen häufig weder direkt durch NO, noch direkt durch die HO-1 vermittelt werden, sondern durch das Hämabbauprodukt CO (Otterbein et al., 2000; Taille et al., 2005; Zhang et al., 2003). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das durch eine Vorbehandlung mit CO-freisetzenden-Molekülen (*CO-releasing molecules*, CORM) entstehende CO in der Lage ist, die TLR4- und MD2-Expression auf Zellen des angeborenen Immunsystems herunterzuregulieren und so eine Toleranz zu erzeugen (Riquelme et al., 2015). Unterstützt wird diese Annahme durch Veröffentlichungen, die sowohl für die Gabe von CORM (Qin et al., 2013; Sawle et al., 2005) als auch für die Inhalation von niedrigdosiertem CO schützende Effekte nachgewiesen haben (Otterbein et al., 2000; Sarady et al., 2004). Mittlerweile werden diese Erkenntnisse auch durch Ergebnisse aus der klinischen Forschung untermauert: So konnten Takaki et al. (2010) verdeutlichen, dass die Letalität von Sepsis-Patienten mit niedrigeren HO-1- und CO-Spiegeln in ihrem Blut korreliert. Weiterhin demonstrierten Sheu et al. (2009), dass bestimmte Polymorphismen für HO-1 mit einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber der Entstehung eines ARDS zusammenhängen.

Im Hinblick auf die komplexe Pathogenese eines SIRS gibt es inzwischen erste Untersuchungen, die die zytoprotektiven Eigenschaften einer HO-1-Induktion auch im Rahmen einer DAMP-vermittelten Organschädigung nachweisen konnten: So führte sowohl eine HO-1-Induktion als auch die Verabreichung eines CORM zu einer reduzierten iNOS-Expression und einer verringerten Freisetzung eines wichtigen DAMPs, dem *high mobility group box 1* (HMGB1) Protein (Park et al., 2013; Tsoyi et al., 2009b). In einem Modell an HO-1-Knockout-Mäusen war diesem DAMP zuvor eine wichtige Rolle im Bezug auf die LPS-assoziierte Letalität zugeschrieben worden (Takamiya et al., 2009).

Insgesamt besitzt die HO-1 somit breite, protektive Eigenschaften, die den in dieser Arbeit beobachteten Schutz der Lunge vor einem potenziell tödlichen LPS- oder LTA:PepG- Stimulus erklären.

Konklusion

Die hier vorgelegte Arbeit zeigte zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung erstmals, dass die im Rattenmodell der pulmonalen Endotoxintoleranz beobachtete Organprotektion vermutlich durch eine iNOS-vermittelte Steigerung der HO-1-Aktivität induziert wird. Hierbei hängt ihre Entstehung nicht direkt von einer iNOS-abhängigen NO-Produktion ab, sondern von einer NO-bedingten Steigerung der HO-1-Synthese und -Aktivität. Eine Rolle dieses induktiven Zusammenhangs könnte möglicherweise auch im Rahmen einer Kreuztoleranz der Lunge bestehen. Auch hier zeigte sich eine veränderte Regulation der HO-1 nach iNOS-Inhibition.

Die präsentierten Daten können als wichtige Grundlage für die Entwicklung innovativer Therapiestrategien der Sepsis angesehen werden. Da die meisten klinisch eingeführten, neuen Therapieansätze in der Praxis gescheitert sind, ist die Suche nach solchen alternativen Therapien unabdingbar (Dhainaut et al., 1994; Fisher et al., 1994; Greenman et al., 1991; Numata et al., 1998; Ziegler et al., 1991). Die Nutzung der HO-1-induzierten Organprotektion ist hierbei eine vielversprechende Möglichkeit einer adjunktiven Therapie und wurde bereits in ersten klinischen Studien getestet (Ryter und Choi, 2009).

5. Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit sollte eine mögliche Rolle der inflammatorischen Mediatoren iNOS und HO-1 für die Lungenprotektion im Rahmen von Endotoxin- und Kreuztoleranz untersucht werden. Hierzu wurden Wistar Ratten zunächst mit einer niedrigen Dosis von Lipopolysaccharid (LPS: 1 mg/kg i.p.) vorbehandelt. 24 Stunden später wurde am instrumentierten Tier eine systemische Inflammation entweder mit hochdosiertem LPS (6 mg/kg i.v.) oder mit Lipoteichonsäure (LTA: 3 mg/kg i.v.) und Peptidoglykan (PepG: 10 mg/kg i.v.) induziert. Im Verlauf der nächsten 6 Stunden wurde der arterielle Mitteldruck der Tiere gemessen und die Sterblichkeit dokumentiert. In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte 6 Stunden nach Stimulation die Entnahme der Rattenlungen. Hierbei wurde ein möglicher Einfluss der LPS-Vorbehandlung auf die pulmonale Inflammation und HO-1-Synthese untersucht.

Die Präkonditionierung mit niedrigdosiertem LPS führte im Vergleich zu einer Vorbehandlung mit NaCl nach Stimulation mit hochdosiertem LPS bzw. LTA und PepG zu einer Stabilisierung des arteriellen Mitteldrucks und verbesserte das Überleben der Tiere. In den Rattenlungen führte die Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS zu einer attenuierten inflammatorischen Reaktion und Schädigung, ablesbar an einer niedrigeren MPO-Aktivität und einem geringer ausgeprägten Lungenödem. Dies ging in beiden Modellen mit einer signifikanten Erhöhung der pulmonalen HO-1-Proteinspiegel einher. Somit konnte in der hier vorgestellten Arbeit durch die LPS-Vorbehandlung sowohl eine Endotoxin- als auch eine Kreuztoleranz induziert werden. Diese Toleranzentwicklung schützte die Lunge vor den Folgen eines nachgeschalteten, potenziell tödlichen Stimulus aus Zellwandbestandteilen gramnegativer und grampositiver Bakterien.

Um einen möglichen Einfluss der iNOS bzw. der HO-1 auf die Entstehung der Lungenprotektion näher zu beleuchten, wurde weiteren Gruppen zusätzlich zu der LPS-Vorbehandlung entweder zeitgleich der iNOS-Inhibitor 1400W (5 mg/kg i.p.) oder 18 Stunden nach Vorbehandlung der HO-1-Inhibitor SnPPiX (50 µmol/kg i.p.) appliziert. In beiden Fällen hob dies die Lungenprotektion wieder auf oder schwächte sie deutlich ab. Im Rahmen der Endotoxin- und Kreuztoleranz steigert die Vorbehandlung mit niedrigdosiertem LPS somit die pulmonale iNOS-Aktivität und führt konsekutiv möglicherweise über eine vermehrte Bildung und Aktivierung der pulmonalen HO-1 zu einer Lungenprotektion.

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definition Sepsis/SIRS mit klinischer Gradeinteilung	12
Tabelle 2: Berlin Definition des ARDS.....	14
Tabelle 3: <i>Toll-like</i> Rezeptoren (TLR) und ihre spezifischen Agonisten.....	21
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien für den Griess Assay.....	41
Tabelle 5: Nitrit- und Nitrat-Eichlösungsreihe.....	42
Tabelle 6: Verwendete Reagenzien für den Lysepuffer	44
Tabelle 7: Lysepuffer für die Homogenisierung.....	45
Tabelle 8: Proteinstandardreihe für den <i>Bradford Assay</i>	47
Tabelle 9: Verwendete Reagenzien für die Gelelektrophorese.....	50
Tabelle 10: Mischungsverhältnis der Polyacrylamidgele.....	51
Tabelle 11: Verwendete Reagenzien für den <i>Western Blot</i>	53
Tabelle 12: Verwendete Reagenzien für die Immundetektion.....	56
Tabelle 13: Verwendete Reagenzien für den MPO Aktivitätsassay	58

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mögliche Verläufe der Immunantwort bei einer Sepsis.....	18
Abbildung 2: TLR-abhängige Signaltransduktion.....	22
Abbildung 3: Stickstoffmonoxid-Synthese.....	25
Abbildung 4: Vereinfachtes Modell der Reaktion von NO und Superoxid.....	27
Abbildung 5: Hämabbau durch die HO-1	29
Abbildung 6: Induktoren von oxidativem Stress und HO-1-assoziierte Antworten.....	30
Abbildung 7: Zeitverlauf des Modells der Endotoxintoleranz	33
Abbildung 8: Zeitverlauf des Modells der Kreuztoleranz.....	34
Abbildung 9: Tierversuche zur iNOS-Funktion und -Inhibition	36
Abbildung 10: Versuchsaufbau des Rattenmodells	39
Abbildung 11: Aufbau des <i>Western Blot Sandwiches</i>	54
Abbildung 12: Plasmanitritkonzentration.....	62
Abbildung 13: Arterieller Mitteldruck im Modell der Endotoxintoleranz.....	63
Abbildung 14: Pulmonale Myeloperoxidaseaktivität im Modell der Endotoxintoleranz .	66
Abbildung 15: Pulmonale <i>wet-to-dry ratio</i> im Modell der Endotoxintoleranz.....	67
Abbildung 16: Pulmonale HO-1-Proteinmenge im Modell der Endotoxintoleranz.....	68
Abbildung 17: Arterieller Mitteldruck im Modell der Kreuztoleranz.....	70
Abbildung 18: Pulmonale Myeloperoxidaseaktivität im Modell der Kreuztoleranz.....	72
Abbildung 19: Pulmonale <i>wet-to-dry ratio</i> im Modell der Kreuztoleranz	73
Abbildung 20: Pulmonale HO-1-Proteinmenge im Modell der Kreuztoleranz	74

8. Verzeichnis der verwendeten Materialien

8.1 Chemikalien

30 % Acrylamide/Bis Soln	Bio-Rad, München, Deutschland
<i>Albumin fraction V</i> (bovin, BSA)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Aprotinin $C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$, M: 6511,52 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
1400W N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamide·2HCl $C_{10}H_{15}N_3 \cdot 2HCl$, M: 177,3 g/mol	Alexis Biochemicals, Wien, Österreich
Anti- β -Actin, monoklonal, rekombinant Maus	Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA
Anti-Hämoxygenase-1, polyklonal, rekombinant Kaninchen	StressGen, Yorkshire, Großbritannien
Anti-Kaninchen IgG:HRP Konjugat, polyklonal, rekombinant Ziege	StressGen, Yorkshire, Großbritannien
Anti-Maus IgG:HRP Konjugat, polyklonal, rekombinant Ziege	StressGen, Yorkshire, Großbritannien
Aqua dest. H_2O , M : 18,0 g/mol	Universitätsapotheker, Düsseldorf, Deutschland
Bromophenolblau $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$, M: 669,96 g/mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Desoxycholat $C_{24}H_{40}O_4$; M: 392,5 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

O-Dianisidine Dihydrochlorid $C_{14}H_{16}N_2O_2 \cdot 2HCl$; M: 317,21 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dikaliumphosphat K_2HPO_4 ; M: 174,18 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) C_2H_6OS ; M: 78,1 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol CH_3CH_2OH ; M: 46,07 g/mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) $C_{10}H_{16}N_2O_8$; M: 292,2 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Flavin adenine dinucleotide (FAD) disodium salt hydrate</i> $C_{27}H_{31}N_9Na_2O_{15}P_2 \cdot xH_2O$ M: 829,51 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerol $HOCH_2CH(OH)CH_2OH$), M: 92,1 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycine $C_2H_5NO_2$; M: 75,1 g/mol	Fluka, Buchs, Schweiz
Griess Reagenz A und B	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Heat shock protein (Hsp) 32 / Hämoxygenase-1, rekombinant Ratte</i>	StressGen, Yorkshire, Großbritannien
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB) $CH_3(CH_2)_{15}N(Br)(CH_3)_3$, M: 364,45 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hydrogenperoxid, 30 % H_2O_2 , M: 34,01 g/mol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Isotone Kochsalzlösung 0,9 % NaCl, M: 58,442 g/mol	Universitätsapotheker, Düsseldorf, Deutschland
<i>Kaleidoscope prestained standard</i> (<i>Rainbow Marker</i>)	Bio-Rad, Munich, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat KH ₂ PO ₄ ; M: 136,09 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Leupeptin C ₂₀ H ₃₈ N ₆ O ₄ · ½ H ₂ SO ₄ , M: 475,59 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS), (<i>Escherichia coli</i> 0111:B4)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lipoteichoichonsäure (LTA), (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Milchpulver (entrahmt)	Fluka, Buchs, Schweiz
2-Mercaptoethanol HSCH ₂ CH ₂ OH; M: 78,1 g/mol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Methanol CH ₃ OH; M: 32,0 g/mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid NaCl; M: 58,4 g/mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>β-Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate</i> NADPH C ₂₁ H ₂₆ N ₇ Na ₄ O ₁₇ P ₃ , M: 833,35 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nitratreduktase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Peptidoglykan (PepG)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) $C_7H_7O_2SF$; M: 174,2 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat ,Tween [®] 20 $C_{58}H_{114}O_{26}$; M: 1227, 72	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Sodium dodecyl sulfat (SDS) $C_{12}H_{25}NaO_4S$; M: 288,4 g/mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sodium pyruvate $CH_3COCOONa$; M: 110104 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sodium Thiopenton (Trapanal)	Universitätsapotheke, Düsseldorf, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED) $C_6H_{16}N_2$; M: 116.2 g/mol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma 7-9 [®]) $NH_2C(CH_2OH)_3$; M: 121,1 g/mol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton [®] X-100 $C_3OH_{32}N_4O_8$; M: 624,0 g/mol	Sigma Chemical, St. Louis, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (Tris HCl) ; $NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot HCl$; M: 157,6 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

8.2 Laborausüstung

Analysewaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
BioRad GS 700 <i>Imaging Densitometer</i>	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Digitales pH-Messgerät 646	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Druckwandler 1050	UFI, Morro Bay, Kalifornien, USA
Elektrophorese-Gerät <i>Power supply-EPS 1001</i>	Bio-Rad, München Deutschland
Elektrophorese-Ausrüstung Miniprotean 3	Bio-Rad, München Deutschland
Galaxy Mini Zentrifuge	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Heizgerät	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Magnetplatten: Variomag Magnetrührer	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
<i>µQuant microplate Spectrophotometer</i>	Bio-Tek, Winooski, Vermont, USA
Operationsbesteck	Universitätsklinikum Düsseldorf
Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>PowerLab</i>	ADInstruments Ltd., Spechbach, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schüttler: <i>Spindrive orbital shaker platform</i>	Scienceware, Pequannock, New Jersey, USA

Trockenofen	Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA
Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD 2070	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortexer	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Verstärkerkassette	Eastman Kodak, Rochester, New Jersey, USA
Zentrifuge 5471R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

8.3 Verbrauchsmaterialien

Chemilumineszenz <i>assay</i>	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Entwickler: <i>Kodak Readymatic dental chemicals</i>	Eastman Kodak, Rochester, New York, USA
FuGENE 6	<i>Roche Diagnostics Ltd.</i> , Mannheim, Deutschland
Fixierer: <i>Kodak Readymatic dental chemicals</i>	Eastman Kodak, Rochester, New York, USA
Transparente Folien	Ahrend, Dreiech bei Frankfurt am Main, Deutschland
Gel <i>Blotting</i> Papier	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Hybond ECL Nitrozellulosemembranen	Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien

Hyperfilm MP (Röntgenfilm)	Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Kryoboxen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml ; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Standardracks	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

9. Literaturverzeichnis

Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: 1137-1145

Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 2003; 31: 195-199

Adams JM, Hauser CJ, Livingston DH, Lavery RF, Fekete Z, Deitch EA. Early trauma polymorphonuclear neutrophil responses to chemokines are associated with development of sepsis, pneumonia, and organ failure. *J Trauma* 2001; 51: 452-457

Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 2009; 101: 36-47

Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; 369: 840-851

Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005; 365: 63-78

Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2: 319-323

Bachofen M, Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116: 589-615

Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest* 1991; 64: 648-655

Baumgarten G, Knuefermann P, Schuhmacher G, Vervolgyi V, von Rappard J, Dreiner U, Fink K, Djoufack C, Hoeft A, Grohe C, Knowlton AA, Meyer R. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 2006a; 25: 43-49

Baumgarten G, Knuefermann P, Wrigge H, Putensen C, Stapel H, Fink K, Meyer R, Hoeft A, Grohe C. Role of Toll-like receptor 4 for the pathogenesis of acute lung injury in Gram-negative sepsis. *Eur J Anaesthesiol* 2006b; 23: 1041-1048

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5

Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 2009; 30: 475-487

Boehm O, Knuefermann P, Plueck J, Schwederski M, Ehrentraut H, Kebir S, Lohner R, Velten M, Morath S, Koch A, Zacharowski K, Grohe C, Hoeft A, Baumgarten G, Meyer R. TLR2 stimulation induces cardiac inflammation but not cardiac depression in vivo. *J Inflamm* 2013; 10: 33

- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001; 2: 907-916
- Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992; 101: 1481-1483
- Bone RC. Why sepsis trials fail. *JAMA* 1996a; 276: 565-566
- Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996b; 24: 1125-1128
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
- Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 1982a; 60: 618-622
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982b; 78: 206-209
- Brookes PS, Salinas EP, Darley-Usmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley-Usmar VM, Anderson PG. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J Biol Chem* 2000; 275: 20474-20479
- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1440-1450
- Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 2006; 368: 157-169
- Brunkhorst FM. Epidemiology, economy and practice - results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet). *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2006; 41: 43-44
- Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981; 112: 195-203
- Camhi SL, Alam J, Otterbein L, Sylvester SL, Choi AM. Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 387-398
- Carbajal-Guerrero J, Cayuela-Dominguez A, Fernandez-Garcia E, Aldabo-Pallas T, Marquez-Vacaro JA, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J. Epidemiology and long-term outcome of sepsis in elderly patients. *Med Intensiva* 2014; 38: 21-32
- Carraway MS, Ghio AJ, Taylor JL, Piantadosi CA. Induction of ferritin and heme oxygenase-1 by endotoxin in the lung. *Am J Physiol* 1998; 275: 583-592

Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 2006; 10: 233

Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 1992; 175: 1111-1122

Chen K, Maines MD. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000; 46: 609-617

Chen R, Zhou H, Beltran J, Malellari L, Chang SL. Differential expression of cytokines in the brain and serum during endotoxin tolerance. *J Neuroimmunol* 2005; 163: 53-72

Cobb JP, Hotchkiss RS, Swanson PE, Chang K, Qiu Y, Laubach VE, Karl IE, Buchman TG. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene deficiency increases the mortality of sepsis in mice. *Surgery* 1999; 126: 438-442

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420: 885-891

Colletti LM, Remick DG, Campbell DA, Jr. LPS pretreatment protects from hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 1994; 57: 337-343

De Kimpe SJ, Kengatharan M, Thiemermann C, Vane JR. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10359-10363

Dhainaut JF, Tenailon A, Le Tulzo Y, Schlemmer B, Solet JP, Wolff M, Holzapfel L, Zeni F, Dreyfuss D, Mira JP, et al. Platelet-activating factor receptor antagonist BN 52021 in the treatment of severe sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. BN 52021 Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 1994; 22: 1720-1728

Dias MB, Almeida MC, Carnio EC, Branco LG. Role of nitric oxide in tolerance to lipopolysaccharide in mice. *J Appl Physiol* 2005; 98: 1322-1327

Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, Cody MJ, Michalek SM, Rice NR, Vogel SN. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol* 2003; 170: 508-519

Doerschuk CM. Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages. *Respir Res* 2000; 1: 136-140

Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, Hunninghake GM, An CH, Fredenburgh L, Massaro AF, Rogers A, Gazourian L, Nakahira K, Haspel JA, Landazury R, Eppanapally S, Christie JD, Meyer NJ, Ware LB, Christiani DC, Ryter SW, Baron RM, Choi AM. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 1225-1234

Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Occurrence and outcomes of sepsis: influence of race. *Crit Care Med* 2007; 35: 763-768

Dominguez Fernandez E, Flohe S, Siemers F, Nau M, Schade FU. Endotoxin tolerance in rats: influence on LPS-induced changes in excretory liver function. *Inflamm Res* 2002; 51: 500-505

Dweik RA. Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! *Thorax* 2005; 60: 265-267

Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med* 2009; 37: 30-37

Ehrentraut H, Meyer R, Schwederski M, Ehrentraut S, Velten M, Grohe C, Knuefermann P, Baumgarten G, Boehm O. Systemically administered ligands of Toll-like receptor 2, -4, and -9 induce distinct inflammatory responses in the murine lung. *Mediators Inflamm* 2011; 2011: 746532

Ehrentraut S, Frede S, Stapel H, Mengden T, Grohe C, Fandrey J, Meyer R, Baumgarten G. Antagonism of lipopolysaccharide-induced blood pressure attenuation and vascular contractility. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2170-2176

Ehrentraut SF, Dorr A, Ehrentraut H, Lohner R, Lee SH, Hoeft A, Baumgarten G, Knuefermann P, Boehm O, Meyer R. Vascular dysfunction following polymicrobial sepsis: role of pattern recognition receptors. *PLoS One* 2012; 7: 4453

Eisner MD, Thompson T, Hudson LD, Luce JM, Hayden D, Schoenfeld D, Matthay MA, Acute Respiratory Distress Syndrome N. Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164: 231-236

Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33: 606-618

Fahmi H, Charon D, Mondange M, Chaby R. Endotoxin-induced desensitization of mouse macrophages is mediated in part by nitric oxide production. *Infect Immun* 1995; 63: 1863-1869

Fernandez-Ruiz I, Arnalich F, Cubillos-Zapata C, Hernandez-Jimenez E, Moreno-Gonzalez R, Toledano V, Fernandez-Velasco M, Vallejo-Cremades MT, Esteban-Burgos L, de Diego RP, Llamas-Matias MA, Garcia-Arumi E, Marti R, Bosca L, Andreu AL, Lopez-Sendon JL, Lopez-Collazo E. Mitochondrial DAMPs induce endotoxin tolerance in human monocytes: an observation in patients with myocardial infarction. *PLoS One* 2014; 9: 95073

Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, Iberti TJ, Rackow EC, Shapiro MJ, Greenman RL. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA* 1994; 271: 1836-1843

Flohe S, Heinrich PC, Schneider J, Wendel A, Flohe L. Time course of IL-6 and TNF alpha release during endotoxin-induced endotoxin tolerance in rats. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 1607-1614

Flohe S, Dominguez Fernandez E, Ackermann M, Hirsch T, Borgermann J, Schade FU. Endotoxin tolerance in rats: expression of TNF-alpha, IL-6, IL-10, VCAM-1 AND HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. *Cytokine* 1999; 11: 796-804

Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012; 307: 2526-2533

Foster SJ. Analysis of the autolysins of *Bacillus subtilis* 168 during vegetative growth and differentiation by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J Bacteriol* 1992; 174: 464-470

Garrett RH, Nason A. Involvement of a B-type cytochrome in the assimilatory nitrate reductase of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967; 58: 1603-1610

Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle BJ, Knowles RG. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1997; 272: 4959-4963

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278: 8869-8872

Graf J, Brunkhorst FM, Reinhart K. Sepsis - Langzeitfolgen und sozioökonomische Bedeutung. *Ärzteblatt Thüringen* 2007; 18: 423-426

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138

Greenman RL, Schein RM, Martin MA, Wenzel RP, MacIntyre NR, Emmanuel G, Chmel H, Kohler RB, McCarthy M, Plouffe J. A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. The XOMA Sepsis Study Group. *JAMA* 1991; 266: 1097-1102

Gross SS, Kilbourn RG, Griffith OW. NO in septic shock: good, bad or ugly? Learning from iNOS knockouts. *Trends Microbiol* 1996; 4: 47-49

- Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 1994; 94: 2407-2413
- Hartsfield CL, Alam J, Cook JL, Choi AM. Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 1997; 273: 980-988
- Heemann U, Szabo A, Hamar P, Muller V, Witzke O, Lutz J, Philipp T. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury : possible connection to an interleukin-6-dependent pathway. *Am J Pathol* 2000; 156: 287-293
- Hickey MJ, Sihota E, Amrani A, Santamaria P, Zbytniuk LD, Ng ES, Ho W, Sharkey KA, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in endotoxemia: chimeric mice reveal different cellular sources in various tissues. *FASEB J* 2002; 16: 1141-1143
- Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 2000; 165: 618-622
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-150
- Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 2012; 32: 23-63
- Jacinto R, Hartung T, McCall C, Li L. Lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced tolerance and cross-tolerance: distinct alterations in IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol* 2002; 168: 6136-6141
- Jozkowicz A, Dulak J. Effects of protoporphyrins on production of nitric oxide and expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells and macrophages. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 69-79
- Kim YG, Park JH, Shaw MH, Franchi L, Inohara N, Nunez G. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity* 2008; 28: 246-257
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 598-625
- Knauert M, Vangala S, Haslip M, Lee PJ. Therapeutic applications of carbon monoxide. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 360815
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258

Koch A, Boehm O, Zacharowski PA, Loer SA, Weimann J, Rensing H, Foster SJ, Schmidt R, Berkels R, Reingruber S, Zacharowski K. Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in the lung during lipopolysaccharide tolerance and cross tolerance. *Crit Care Med* 2007; 35: 2775-2784

Kolodziejcki PJ, Koo JS, Eissa NT. Regulation of inducible nitric oxide synthase by rapid cellular turnover and cotranslational down-regulation by dimerization inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 18141-18146

Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 279-289

Konrad FM, Braun S, Ngamsri KC, Vollmer I, Reutershan J. Heme oxygenase-1 attenuates acute pulmonary inflammation by decreasing the release of segmented neutrophils from the bone marrow. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 307: 707-717

Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1250-1254

Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain SN. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1883-1889

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685

Lang T, Mansell A. The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 425-434

Lee HK, Lee J, Tobias PS. Two lipoproteins extracted from *Escherichia coli* K-12 LCD25 lipopolysaccharide are the major components responsible for Toll-like receptor 2-mediated signaling. *J Immunol* 2002; 168: 4012-4017

Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 2002; 8: 240-246

Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001; 166: 5161-5167

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, Sccm/Esicm/Accp/Ats/Sis. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31: 1250-1256

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 678-689

- Lin NT, Yang FL, Lee RP, Peng TC, Chen HI. Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: the time course in conscious and septic rats. *Life Sci* 2006; 78: 1038-1043
- Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzappel L, Breen D, Silverman MS, Takala J, Donaldson J, Arneson C, Grove G, Grossman S, Grover R. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004; 32: 21-30
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 323-350
- MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5243-5248
- Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988; 27: 8706-8711
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-1554
- Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 2012; 122: 2731-2740
- Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: 379-399
- Medina A, Nicholas DJ. Interference by reduced pyridine nucleotides in the diazotization of nitrite. *Biochim Biophys Acta* 1957; 23: 440-442
- Medvedev AE, Henneke P, Schromm A, Lien E, Ingalls R, Fenton MJ, Golenbock DT, Vogel SN. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J Immunol* 2001; 167: 2257-2267
- Medvedev AE, Vogel SN. Overexpression of CD14, TLR4, and MD-2 in HEK 293T cells does not prevent induction of in vitro endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* 2003; 9: 60-64
- Meng X, Brown JM, Ao L, Nordeen SK, Franklin W, Harken AH, Banerjee A. Endotoxin induces cardiac HSP70 and resistance to endotoxemic myocardial depression in rats. *Am J Physiol* 1996; 271: 1316-1324
- Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 2008; 14: 64-78

Morath S, Geyer A, Spreitzer I, Hermann C, Hartung T. Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic Acid preparations. *Infect Immun* 2002; 70: 938-944

Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-896

Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, Winslow RM. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol* 1996; 270: 107-114

Murphey ED, Fang G, Sherwood ER. Pretreatment with the Gram-positive bacterial cell wall molecule peptidoglycan improves bacterial clearance and decreases inflammation and mortality in mice challenged with *Staphylococcus aureus*. *Crit Care Med* 2008a; 36: 3067-3073

Murphey ED, Fang G, Sherwood ER. Endotoxin pretreatment improves bacterial clearance and decreases mortality in mice challenged with *Staphylococcus aureus*. *Shock* 2008b; 29: 512-518

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78: 915-918

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846-852

Nicholson SC, Hahn RT, Grobmyer SR, Brause JE, Hafner A, Potter S, Devereux RB, Nathan CF. Echocardiographic and survival studies in mice undergoing endotoxic shock: effects of genetic ablation of inducible nitric oxide synthase and pharmacologic antagonism of platelet-activating factor. *J Surg Res* 1999; 86: 198-205

Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000; 164: 3476-3479

Numata M, Suzuki S, Miyazawa N, Miyashita A, Nagashima Y, Inoue S, Kaneko T, Okubo T. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *J Immunol* 1998; 160: 3031-3037

Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol* 2006; 177: 1967-1974

Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000; 6: 422-428

Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1895-1903

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526

Park EJ, Jang HJ, Tsoyi K, Kim YM, Park SW, Kim HJ, Lee JH, Chang KC. The heme oxygenase-1 inducer THI-56 negatively regulates iNOS-Expression and HMGB1 release in LPS-activated RAW 264.7 cells and CLP-induced septic mice. *PLoS One* 2013; 8: 76293

Parsons PE, Fowler AA, Hyers TM, Henson PM. Chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 490-493

Pastor C, Teisseire B, Vicaut E, Payen D. Effects of L-arginine and L-nitro-arginine treatment on blood pressure and cardiac output in a rabbit endotoxin shock model. *Crit Care Med* 1994; 22: 465-469

Pheng LH, Francoeur C, Denis M. The involvement of nitric oxide in a mouse model of adult respiratory distress syndrome. *Inflammation* 1995; 19: 599-610

Phua J, Badia JR, Adhikari NK, Friedrich JO, Fowler RA, Singh JM, Scales DC, Stather DR, Li A, Jones A, Gattas DJ, Hallett D, Tomlinson G, Stewart TE, Ferguson ND. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 220-227

Piotrowski J, Jedrzejewski T, Kozak W. Heme oxygenase-1 induction by cobalt protoporphyrin enhances fever and inhibits pyrogenic tolerance to lipopolysaccharide. *J Therm Biol* 2014; 45: 69-74

Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock* 2008; 30: 53-59

Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan EK, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel SN, Beutler B. Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24: 340-355

Qin W, Zhang J, Lv W, Wang X, Sun B. Effect of carbon monoxide-releasing molecules II-liberated CO on suppressing inflammatory response in sepsis by interfering with nuclear factor kappa B activation. *PLoS One* 2013; 8: 75840

Qu J, Zhang J, Pan J, He L, Ou Z, Zhang X, Chen X. Endotoxin tolerance inhibits lipopolysaccharide-initiated acute pulmonary inflammation and lung injury in rats by the mechanism of nuclear factor-kappaB. *Scand J Immunol* 2003; 58: 613-619

Raffaini MS, Dias MB, Branco LG. Central heme oxygenase-carbon monoxide pathway participates in the lipopolysaccharide-induced tolerance in rats. *Brain Res* 2006; 1111: 83-89

Razavi HM, Wang le F, Weicker S, Rohan M, Law C, McCormack DG, Mehta S. Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis: role of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 227-233

Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 3116-3120

Reutershan J, Basit A, Galkina EV, Ley K. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: 807-815.

Riquelme SA, Bueno SM, Kalergis AM. Carbon monoxide down-modulates Toll-like receptor 4/MD2 expression on innate immune cells and reduces endotoxic shock susceptibility. *Immunology* 2015; 144: 321-332

Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 99-126

Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 2005; 353: 1685-1693

Rudkowski JC, Barreiro E, Harfouche R, Goldberg P, Kishta O, D'Orleans-Juste P, Labonte J, Lesur O, Hussain SN. Roles of iNOS and nNOS in sepsis-induced pulmonary apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: 793-800

Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 41: 251-260

Sarady JK, Zuckerbraun BS, Bilban M, Wagner O, Usheva A, Liu F, Ifedigbo E, Zamora R, Choi AM, Otterbein LE. Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver. *FASEB J* 2004; 18: 854-856

Sawle P, Foresti R, Mann BE, Johnson TR, Green CJ, Motterlini R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 800-810

Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191-195

Schumann RR, Leong SR, Flagg GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249: 1429-1431

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 17406-17409

Shames BD, Meldrum DR, Selzman CH, Pulido EJ, Cain BS, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Increased levels of myocardial IkappaB-alpha protein promote tolerance to endotoxin. *Am J Physiol* 1998; 275: 1084-1091

Shelton JL, Wang L, Cepinskas G, Sandig M, Scott JA, North ML, Inculet R, Mehta S. Inducible NO synthase (iNOS) in human neutrophils but not pulmonary microvascular endothelial cells (PMVEC) mediates septic protein leak in vitro. *Microvasc Res* 2007; 74: 23-31

Sheu CC, Zhai R, Wang Z, Gong MN, Tejera P, Chen F, Su L, Thompson BT, Christiani DC. Heme oxygenase-1 microsatellite polymorphism and haplotypes are associated with the development of acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 2009; 35: 1343-1351

Sheu CC, Gong MN, Zhai R, Chen F, Bajwa EK, Clardy PF, Gallagher DC, Thompson BT, Christiani DC. Clinical characteristics and outcomes of sepsis-related vs non-sepsis-related ARDS. *Chest* 2010; 138: 559-567

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189: 1777-1782

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 405-455

Singh NR, Johnson A, Peters AM, Babar J, Chilvers ER, Summers C. Acute lung injury results from failure of neutrophil de-priming: a new hypothesis. *Eur J Clin Invest* 2012; 42: 1342-1349

Soszynski D. Inhibition of nitric oxide synthase delays the development of tolerance to LPS in rats. *Physiol Behav* 2002; 76: 159-169

Speyer CL, Neff TA, Warner RL, Guo RF, Sarma JV, Riedemann NC, Murphy ME, Murphy HS, Ward PA. Regulatory effects of iNOS on acute lung inflammatory responses in mice. *Am J Pathol* 2003; 163: 2319-2328

Sprung CL, Sakr Y, Vincent JL, Le Gall JR, Reinhart K, Ranieri VM, Gerlach H, Fielden J, Groba CB, Payen D. An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence In Acutely Ill Patients (SOAP) study. *Intensive Care Med* 2006; 32: 421-427

Srisook K, Cha YN. Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1709-1720

Statistisches Bundesamt, 2014: 52 Millionen Operationen und medizinische Prozeduren bei stationären Patienten im Jahr 2013.

https://http://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2014/10/PD14_368_231.html. (Zugriffsdatum 02.02.2015)

- Stoscheck CM. Increased uniformity in the response of the coomassie blue G protein assay to different proteins. *Anal Biochem* 1990; 184: 111-116
- Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 662-680
- Taille C, El-Benna J, Lanone S, Boczkowski J, Motterlini R. Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. *J Biol Chem* 2005; 280: 25350-25360
- Takaki S, Takeyama N, Kajita Y, Yabuki T, Noguchi H, Miki Y, Inoue Y, Nakagawa T, Noguchi H. Beneficial effects of the heme oxygenase-1/carbon monoxide system in patients with severe sepsis/septic shock. *Intensive Care Med* 2010; 36: 42-48
- Takamiya R, Hung CC, Hall SR, Fukunaga K, Nagaishi T, Maeno T, Owen C, Macias AA, Fredenburgh LE, Ishizaka A, Blumberg RS, Baron RM, Perrella MA. High-mobility group box 1 contributes to lethality of endotoxemia in heme oxygenase-1-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 41: 129-135
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805-820
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61: 748-755
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969; 244: 6388-6394
- Thiemermann C. Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol* 1997; 29: 159-166
- Thiemermann C. Interactions between lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*: a structural and functional analysis. *Microbes Infect* 2002; 4: 927-935
- Thommasen HV, Russell JA, Boyko WJ, Hogg JC. Transient leucopenia associated with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1984; 1: 809-812
- Tiao G, Rafferty J, Ogle C, Fischer JE, Hasselgren PO. Detrimental effect of nitric oxide synthase inhibition during endotoxemia may be caused by high levels of tumor necrosis factor and interleukin-6. *Surgery* 1994; 116: 332-338
- Topp SA, Krieg A, Koch A, Tidden CM, Ramp U, Hohlfeld T, Macher A, Schulte am Esch J, Eisenberger CF, Stoecklein NH, Knoefel WT. Hemoglobin-glutamer 200 reduces reperfusion injury of the cold preserved rat liver by induction of heme oxygenase-1. *J Surg Res* 2008; 150: 243-254
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354

Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, Werts C, Boneca IG. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* 2004; 5: 1000-1006

Tsoyi K, Ha YM, Kim YM, Lee YS, Kim HJ, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC. Activation of PPAR-gamma by carbon monoxide from CORM-2 leads to the inhibition of iNOS but not COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages. *Inflammation* 2009a; 32: 364-371

Tsoyi K, Lee TY, Lee YS, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC. Heme-oxygenase-1 induction and carbon monoxide-releasing molecule inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced high-mobility group box 1 release in vitro and improve survival of mice in LPS- and cecal ligation and puncture-induced sepsis model in vivo. *Mol Pharmacol* 2009b; 76: 173-182

van der Poll T, Coyle SM, Moldawer LL, Lowry SF. Changes in endotoxin-induced cytokine production by whole blood after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. *J Infect Dis* 1996; 174: 1356-1360

Varma TK, Durham M, Murphey ED, Cui W, Huang Z, Lin CY, Toliver-Kinsky T, Sherwood ER. Endotoxin priming improves clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in wild-type and interleukin-10 knockout mice. *Infect Immun* 2005; 73: 7340-7347

Villar J, Blanco J, Anon JM, Santos-Bouza A, Blanch L, Ambros A, Gandia F, Carriedo D, Mosteiro F, Basaldua S, Fernandez RL, Kacmarek RM, Network A. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med* 2011; 37: 1932-1941

Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D, Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients I. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34: 344-353

Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K, Investigators EICo. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302: 2323-2329

Wang le F, Patel M, Razavi HM, Weicker S, Joseph MG, McCormack DG, Mehta S. Role of inducible nitric oxide synthase in pulmonary microvascular protein leak in murine sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1634-1639

Wang WW, Smith DL, Zucker SD. Bilirubin inhibits iNOS-Expression and NO production in response to endotoxin in rats. *Hepatology* 2004; 40: 424-433

West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med* 2002; 30: 64-73

West MA, Koons A. Endotoxin tolerance in sepsis: concentration-dependent augmentation or inhibition of LPS-stimulated macrophage TNF secretion by LPS pretreatment. *J Trauma* 2008; 65: 893-900

Wizemann TM, Gardner CR, Laskin JD, Quinones S, Durham SK, Goller NL, Ohnishi ST, Laskin DL. Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 759-768

Wizemann TM, Laskin DL. Enhanced phagocytosis, chemotaxis, and production of reactive oxygen intermediates by interstitial lung macrophages following acute endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 358-365

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-1433

Xiong Y, Medvedev AE. Induction of endotoxin tolerance in vivo inhibits activation of IRAK4 and increases negative regulators IRAK-M, SHIP-1, and A20. *J Leukoc Biol* 2011; 90: 1141-1148

Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Chatterjee PK, Thiemermann C. Endotoxin induces a second window of protection in the rat heart as determined by using p-nitro-blue tetrazolium staining, cardiac troponin T release, and histology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2276-2280

Zacharowski K, Zacharowski PA, Koch A, Baban A, Tran N, Berkels R, Papewalis C, Schulze-Osthoff K, Knuefermann P, Zahringer U, Schumann RR, Rettori V, McCann SM, Bornstein SR. Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal response to systemic inflammatory response syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6392-6397

Zambon M, Vincent JL. Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time. *Chest* 2008; 133: 1120-1127

Zemans RL, Colgan SP, Downey GP. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 40: 519-535

Zhang X, Shan P, Otterbein LE, Alam J, Flavell RA, Davis RJ, Choi AM, Lee PJ. Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3. *J Biol Chem* 2003; 278: 1248-1258

Ziegler EJ, Fisher CJ Jr, Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, Wortel CH, Fink MP, Dellinger RP, Teng NN. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1991; 324: 429-436

Zingarelli B, Halushka PV, Caputi AP, Cook JA. Increased nitric oxide synthesis during the development of endotoxin tolerance. *Shock* 1995; 3: 102-108

Zingarelli B, Hake PW, Cook JA. Inducible nitric oxide synthase is not required in the development of endotoxin tolerance in mice. *Shock* 2002; 17: 478-484

10. Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb nutze ich hier die Gelegenheit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Zuallererst danke ich meinem klinischen Direktor, Prof. Dr. Andreas Hoeft, der mir nicht nur meine klinische Ausbildung ermöglicht, sondern mir währenddessen auch immer wieder die Bedeutung von wissenschaftlicher Arbeit nähergebracht hat.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Doktorvätern Herrn Prof. Dr. Dr. Kai Zacharowski und Herrn Prof. Dr. Georg Baumgarten.

Kai, Dir danke ich für die Bereitstellung des Themas, für die Betreuung während der Versuche und für die vielen tollen Erfahrungen in unserer damaligen Arbeitsgruppe.

Georg, Dir gilt mein Dank für die ermutigende Betreuung während des für mich weitaus schwierigeren und unangenehmeren Teils dieser Dissertation: dem schriftlichen Fixieren der geleisteten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz Dr. med. Olaf Boehm bedanken. Ohne seine langjährige, ausdauernde Unterstützung wäre diese Arbeit wahrscheinlich nie vollendet worden! Dank auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe. Die Zeit mit Euch ist unvergesslich und hat mir gezeigt, wieviel Spaß gemeinsame Forschung machen kann! Außerdem möchte ich mich bei allen Freunden und Weggefährten bedanken, die mich stets aufgebaut und für die erforderliche Abwechslung gesorgt haben.

Last, but not least, danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und vielen weiteren lieben Familienmitgliedern. Ihr habt in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Lebensweg gelegt und mich auch in angespannter, ängstlicher und gestresster Laune ertragen. Dafür werde ich Euch immer unendlich dankbar sein!