Universität Ulm

Universitätsklinik für Anästhesiologie

Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung (APV)

Sektionsleiter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Peter Radermacher

Auswirkungen normobarer Hyperoxie auf zellulären Stress bei murinen Alveolarmakrophagen (AMJ2-C11)

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Clemens Conradin Zeyher

aus Mutlangen

2013

Für euch

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Peter Radermacher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Dietl

Tag der Promotion: 18.12.2014

Abkürzungsverzeichnis IV

1. Einleitung 1

1.1 Sauerstofftherapie in der Medizin 1

1.2 Oxidativer Stress 1

1.3 Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress 7

1.4 Apoptose und Nekrose 11

1.5 Zielsetzung der Arbeit 14

2. Materialien und Methoden 16

2.1 Verwendete Geräte und Materialien 16

2.2 Häufig verwendete Materialien 23

2.3 Methoden 27

3. Ergebnisse 38

3.1 Einfluss der Hyperoxie auf DNA-Schäden 38

3.2 Westernblot 39

3.3 Immunzytochemie 47

3.4 Zusammenfassung 48

4. Diskussion 49

4.1 Diskussion der Methoden und Ergebnisse 49

4.2 Schlussfolgerung 56

5. Zusammenfassung 58

6. Literaturverzeichnis 60

Danksagung 73

Lebenslauf 74

Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer
%	Prozent
&	und
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
$^1O_2$	Singulett-Sauerstoff
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ARE	antioxidant-response-Elements
ATP	Adenosintrisphosphat
Bax	Bcl-2–associated X protein
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
Bcl-2	B-Cell-Lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	Caspase-aktivierte-DNAse
CBP	CREB-binding-Protein

CMH	1-hydroxy-3-methoxycarbonyl -2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Cu	Kupfer
Cyt.	Cytochrom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC	DNA-Protein-crosslink(s)
Dpi	dots per inch
DTT	Dithiothreitol
EMSA	Electrophoretic mobility shift essay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Syntase(n)
etc.	et cetera
Fe	Eisen
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
H_20_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HO-1	Häm-Oxygenase 1
HRP	Meerrettichperoxidase

ICAD	Inhibitor der Caspase-aktivierte-DNAse
IκBα	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IKK	IκBα-Kinase
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Syntase(n)
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LAM	Alveolarmakrophagen
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivated-Protein-Kinase
Max.	Maximal
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimol
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule (Torr)
Na_2EDTA	Dinatriumethylendiamintetraessigsäure
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NEMO	NF-κB essential modifier

NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nm	Nanometer
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid Syntase(n)
$NO^{(\bullet)}$	Stickstoffmonoxid(radikal)
NOS	Stickstoffmonoxid Syntase(n)
NP 40	Nonoxinol 40
Nrf-2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
O_2	Sauerstoff
$O_2^{-\bullet}$	Superoxidradikalanion
$OH^{\bullet}$	Hydroxylradikal
OMM	äußere Mitochondrienmembran
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline
pH	pH-Wert
PI3K	Phopspatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PNPP	*p*-Nitrophenylphosphat
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
Sta	Saurosporin

TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
v.	Version
vgl.	Vergleiche hierzu

1. Einleitung

1.1 Sauerstofftherapie in der Medizin

Sauerstoff wird seit über 200 Jahren zu therapeutischen Zwecken eingesetzt- zunächst experimentell, dann immer systematischer [14, 87]. Angewendet wird Sauerstoffgabe z. B. in der Notfallmedizin bei innerklinischer Reanimation [30], ebenso wie bei hospitalisierten Patienten mit einer ambulant erworbenen Pneumonie. Hierbei wird die Gabe von Sauerstoff bei einer Hypoxämie mit Empfehlungsgrad A empfohlen [72]. Auch bei der chronisch respiratorischen Insuffizienz bei einer Sauerstoffsättigung unter 90% ist die Sauerstoffgabe indiziert [71]. Es konnte gezeigt werden, dass 100 %ige Sauerstoffbeatmung bei Sepsis Organfunktionen verbessern kann [11]. Die „Langzeit-Sauerstofftherapie" findet vor allem Einsatz bei Patienten mit *chronisch-obstruktiver Bronchitis* (COPD). Hier wird die Sauerstoffgabe von 24 Stunden am Tag angestrebt, wobei „die Mindestdauer 16 Stunden pro Tag betragen sollte" [101].

1.2 Oxidativer Stress

Seit Ende des 19. Jahrhunderts [132, 133] wurde zunehmend beobachtet, dass Hyperoxie - also die erhöhte Konzentration von Sauerstoff gegenüber dem Normalzustand - schädlich sein kann. Aufgrund der hohen Relevanz von Sauerstoff im klinischen Alltag ist die sog. Sauerstofftoxizität schon seit langem Gegenstand der Forschung. Zwar konnte *Gilbert* 1957 zeigen, dass Sauerstoff selbst nicht gentoxisch ist [51], doch *Gerschmann* erwägte schon 1954, dass sich unter Hyperoxie vermehrt Sauerstoffradikale bilden [50]. Heute ist man sich einig darüber, dass vor allem die Bildung von *Superoxidradikalanionen* ($O_2^{-\bullet}$), *Singulett-Sauerstoff* ($^1O_2$), *Wasserstoffperoxid* (H_2O_2) und *Lipidperoxiden* für die Toxizität des Sauerstoffs verantwortlich sind [74]. Produkte dieser und diese selbst werden als *Reaktive Sauerstoffspezies* (ROS) bezeichnet [61].

In gesunden Zellen liegen die Produktion und die Eliminierung von ROS in einem Gleichgewicht. Hierfür besitzt die Zelle das *antioxidative System*. Dieses besteht aus verschieden Systemen enzymatischer und nicht enzymatischer Antioxidantien [130]. Ist dieses Gleichgewicht gestört, spricht man von *„oxidativem Stress"* [129]. Unter anderem ist dies bei zu hohen Sauerstoffpartialdrücken der Fall [44]. Daraus resultiert die Toxizität von Sauerstoff.

1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (vgl. **Tabelle 1**) entstehen in aeroben Zellorganismen akzidentiell durch die mitochondriale Atmungskette [73, 143]. Die hierbei entstehenden *Superoxidradikalanione* sind hochreaktiv und bilden zusammen mit anderen Molekülen diverse andere ROS. Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass *Budinger et al.* zeigen konnten, dass auch ohne mitochondriale Atmung während Hyperoxie ROS entstehen [18]. *Pyror* beschreibt hierbei wie diese entstehen können [116]. Eine Auswahl an Reaktionen, welche ROS bilden, findet sich in Abbildung 1. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei die Bildung von *Hydroxylradikalen* ($OH^{\bullet}$), da diese für die Mehrzahl an molekularen Schäden, verantwortlich gemacht werden [23, 33, 45–47, 60].

Tabelle 1: Reaktive Sauerstoffspezies und verwandte Moleküle, verantwortlich für molekulare Schäden. Radikale besitzen eine ungerade Anzahl an Elektronen, Tabelle nach [116]

Name	Symbol	Eigenschaften
Singulett Sauerstoff	$^1O_2$	Kein Radikal
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	Kein Radikal
Peroxinitrit	$ONOO^-$	Kein Radikal
Kohlenstofftrioxidradikalanion	$CO_3^{-\bullet}$	Radikal
Stickstoffmonoxid	$^{\bullet}NO$	Radikal
Stickstoffdioxid	$^{\bullet}NO_2$	Radikal
Hydroxyl	$OH^{\bullet}$	Radikal
Superoxidradikalanion	$O_2^{-\bullet}$	Radikal
Hydroxylperoxyl	$HOO^{\bullet}$	Radikal
Peroxyl	$ROO^{\bullet}$	Radikal

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{2+}/Cu^{2+}} O_2 + OH^- + OH^{\bullet} \quad (1)$$

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (2)$$

$$O_2^{\bullet -} + OH^{\bullet} \longrightarrow {}^1O_2 + OH^- \quad (3)$$

Abb. 1: **(1)**: Haber-Weiss Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikalen aus Superoxidradikalanion und Wasserstoffperoxid [5] **(2)**: Spontane Bildung von Wasserstoffperoxid aus Superoxidradikalanion [5] **(3)**: Bildung von Singulett Sauerstoff aus Superoxidradikalanion und Hydroxylradikalen [3]

ROS werden allerdings nicht nur zufällig gebildet, sondern sind sehr wichtiger Bestandteil der Immunabwehr. Früh wurde entdeckt, dass bei Phagozytose Zellen mehr Sauerstoff verbrauchen, als bei Ruhe [7]. ROS werden von Makrophagen gezielt als sogenannter *„respiratory burst"* zur Immunabwehr genutzt. Hierbei katalysiert die *NADPH-Oxidase* in den Makrophagen die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff, so dass Superoxidradikalanionen entstehen [59] (vgl. **Abb. 2**). Diese werden in Phagosomen gebraucht, um in diesen ROS zu bilden, welche Mikroorganismen abtöten sollen [63].

$$NADPH + 2O_2 \overset{\text{NADPH-Oxidase}}{\rightleftharpoons} NADP^+ + 2O_2^{\bullet -} + H^+$$

Abb. 2: Bildung von Superoxidradikalanionen bei der von der NADPH-Oxidase katalysierten Reaktion [5]

1.2.2 Reaktive Stickstoffspezies

Reaktive Stickstoffspezies werden auch zu den ROS gezählt [130]. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das relativ stabile Radikal *Stickstoffmonooxid* ($NO^{\bullet}$). Entstehen Stickstoffmonoxid und Superoxidradikalanion in größeren Mengen nebeneinander - wie es in aktivierten Makrophagen vorkommt - reagieren beide miteinander zu *Peroxinitrit* [32] (vgl. **Abb.3**).

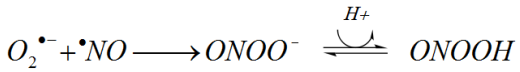

Abb. 3: Bildung von Peroxinitrit aus Superoxidradikalanion und Stickstoffmonoxid [138]

Als Base kann Peroxinitrit ein Proton aufnehmen und als unpolare *Peroxisalpetersäure* in Zellwände diffundieren. Dort zerfällt es in das *Stickstoffdioxid*- und Hydroxylradikal [114] (vgl. **Abb. 4**)

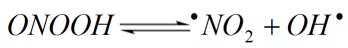

Abb. 4: Zerfall von Peroxisalpetersäure das Stickstoffdioxid- und Hydroxylradikal [138]

Peroxinitrit kann außerdem mit ubiquitär verfügbarem *Kohlenstoffdioxid* reagieren und so das kurzlebige *Nitrosoperoxycarbonat-Ion* bilden. Dieses zerfällt dann in die hochreaktiven Radikale *Stickstoffdioxid und Kohlenstofftrioxiradikalanion* (vgl. **Abb. 5**).

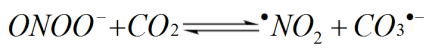

Abb. 5: Bildung von Stickstoffdioxid und Kohlenstofftrioxidradikalanion aus Peroxinitrit und Kohlenstoffdioxid [138]

1.2.2.1 NO-Synthasen

Stickstoffmonoxid wird in der Zelle physiologisch durch die sogenannten *NO-Synthasen (NOS)* gebildet. Es werden drei Isoformen unterschieden: Die *neuronale NOS (nNOS)* und die *endotheliale NOS (eNOS)* sind konstitutive NOS. Ihre Aktivierung ist rasch und *Calmodulin* bzw. *Calcium* abhängig. Ihre Produktion von Stickstoffmonoxid ist konstant, liefert aber nur sehr geringe Mengen. In diesen

Mengen ist Stickstoffmonoxid in homöostatische Prozessen, wie Neurotransmission, Peristaltik und Blutdruckregulation involviert [32].

Die *induzierbare NOS (iNOS)* wurde ursprünglich in Makrophagen entdeckt [68]. Alveolarmakrophagen nutzen die Stickstoffmonoxidprodukion zur Bakterienabwehr [20]. Außerdem nutzen Alveolarmakrophagen Stickstoffmonoxid als Immunomodulator, welches durch iNOS produziert wird [15].

1.2.3 Schädigungsreaktionen durch ROS

In der Literatur sind viele Schäden an Lungengewebe durch (teilweise hyperbare) Hyperoxie beschrieben [2, 21, 86, 122, 140]. Dabei spielen Alveolarmakrophagen eine wichtige Rolle [21], da sie in Homöostase, Immunabwehr, der Antwort auf Fremdsubstanzen und beim sogennanten „tissue remodelling“ [91] erheblichen Einfluss auf die sie umgebende Lunge nehmen. Hyperoxie-induzierte Lungenschäden sind eng mit der Akkumulation von Alveolarmakrophagen assoziiert [64]. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Alveolarmakrophagen bei Hyperoxie Lungengewebe vor Schäden schützt [13].

1.2.3.1 Lipide

Bei der *Lipidperoxidation* kommt es zu einer radikalischen Kettenreaktion. Hierzu kommt es, wenn ungesättigte Fettsäuren durch ROS oxidiert werden. Dabei entstehen Lipidradikale, welche selbst wiederum andere ungesättigte Fettsäuren oxidieren (vgl. **Abb. 6**). Lipidradikale sind verantwortlich für Schäden an Zellmembranen [37, 70, 82] und an der DNA [19, 117].

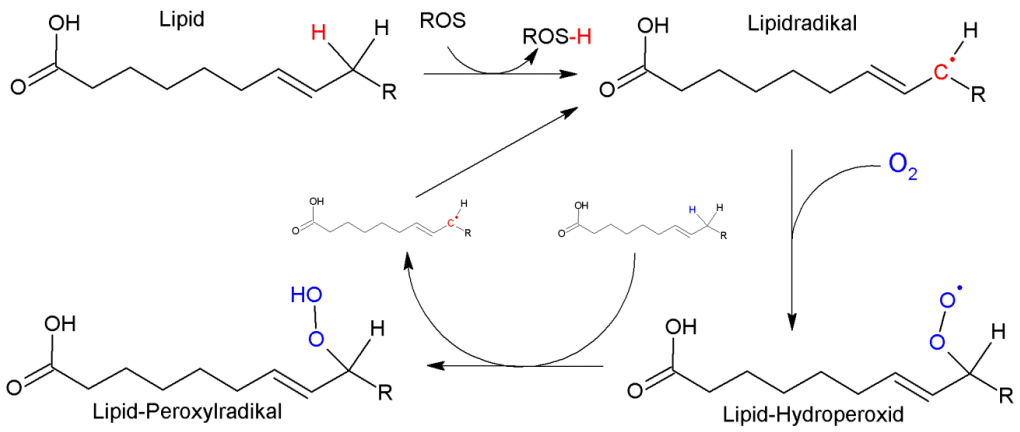

Abb. 6: Mechanismus der Lipidperoxidation

1.2.3.2 Proteine

Proteine und ihre Bausteine die Aminosäuren können auch oxidiert werden. Hierbei unterscheidet man zwischen verschiedenen Reaktionen: Bei der Zerlegung der Polypeptidkette des Proteins werden die Peptidbindungen gespalten. Ebenso können auch die Seitenketten der Proteine oxidiert werden. Wobei weitere reaktive Gruppen gebildet werden. Diese können intra- oder intermolekular weiterreagieren Ein wichtiges Beispiel für die Oxidation von Aminosäuren, ist die Nitrierung von Tyrosin zu 3-Nitrotyrosin [22, 36]. *Beckmann et al.* bewiesen die posttranslationale Nitrierung von Proteinen bei oxidativem Stress. Hierbei spielt die Nitrierung von Tyrosin die wichtigste Rolle [12].Ein sehr guter Marker für nitrosativen Stress durch Peroxinitrit ist 3-Nitrotyrosin [12]. Zudem dient 3-Nitrotyrosin als Anhaltspunkt für DNA-Schäden [1] Peroxinitrit wurde von *Zhuang* 1998 als mutagen und zytotoxisch beschrieben [150].

Durch diese Reaktionen kann die Primär, Sekundär, Tertiär und Quartärstruktur verändert werden, was bis zum totalen Verlust der Proteinfunktion führen kann. Ebenso ist es möglich, dass durch die Proteinmodifikationen, die Proteine nicht mehr abgebaut werden können und sie intrazellulär akkumulieren [128]. Bei einer intermolekularen Reaktion, kann es zu Quervernetzungen von Proteinen untereinander [31], aber auch von Proteinen mit DNA kommen. So entstehen sogenannte *DNA-Protein-Crosslinks* [9].

1.2.3.3 DNA

So wie Proteine und Lipide können ROS auch die DNA schädigen. Dabei attackieren nicht alle ROS die DNA [62]. In der Literatur wird am meisten die Basenmodifikation durch Hydroxylradikale beschrieben. Jedoch sind auch Peroxinitrit und assoziierte Radikale für Induktion von DNA-Schäden bekannt [138]. Es sind mehr als 20 oxidative Schäden an der DNA bekannt [26]. Eine der häufigsten Basenmodifikationen durch ROS ist das 8-*Hydroxyguanine (8-Oxo-2'-deoxyguanosine)* [134] (vgl. **Abb. 7**). Es gilt als prämutagen, da es bei der DNA-Replikation anstatt mit *Cytosin* mit *Adenin* paart [27].

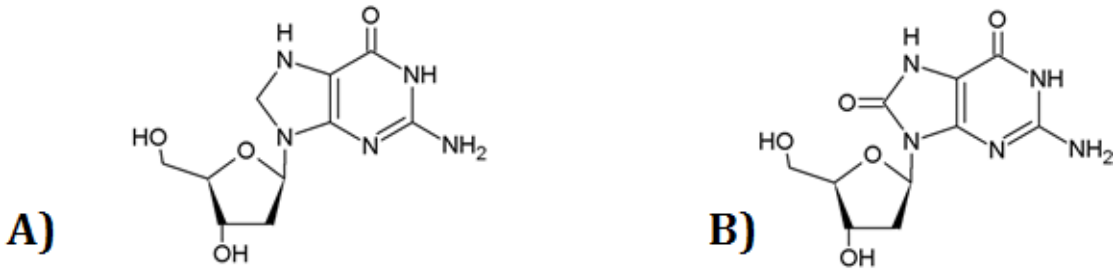

Abb. 7: **A)** Desoxyguanosin **B)** 8-Oxo-2'-desoxyguanosin (8-oxo-dG)

1.3 Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress

1.3.1 Antioxidatives System

Antioxidantien sind jegliche Substanzen, welche in geringeren Konzentrationen als das Oxidationssubstrat dessen Oxidation (z.B. durch ROS) verhindern oder verzögern. *Sies* unterteilt das antioxidative System in fünf Unterkategorien[129]:

1. Prävention
2. Nicht-enzymatische Antioxidantien
3. Enzymatische Antioxidantien
4. Reparatur
5. Adaptation

1.3.1.1 Prävention

Mit Prävention sei gemeint, dass in erster Linie die Entstehung von ROS verhindert werden soll. Dies wird beispielsweise durch Komplexierung von Metallionen durch Proteine erreicht. Dies ist wichtig, da Metallionen durch die *Fenton-Reaktion* [40] (die übergangsmetallkatalysierte Form der *Haber-Weiss-Reaktion, vgl.* **Abb. 1***)* ROS bilden können. Da die Entstehung von Oxidantien nicht vollständig zu verhindern ist, schützt die Zelle ihre DNA, indem sie diese in Chromatin verpackt. Hierdurch werden den Oxidantien Proteine anstatt der wertvollen DNA „angeboten".

1.3.1.2 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Hierbei handelt es sich um Moleküle, welche selbst oxidiert werden, um somit Radikale abzufangen. Hierzu zählen beispielsweise *Glutathion(GSH), Vitamin C* und *Vitamin E.* In dieser Arbeit soll nicht näher darauf eingegangen werden.

1.3.1.3 Enzymatische Antioxidantien

Anaerob lebende eukaryotische Zellen haben sehr wirkungsvolle antioxidative Enzyme. Die wichtigsten drei sind hierbei *die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase, sowie die Glutathion-Peroxidase.* Die SOD katalysiert die Reaktion von Superoxidradikalanion zu H_2O_2. Die Katalase und die Glutathion-Peroxidase wandeln dieses in Sauerstoff und Wasser um (vgl. **Abb. 8**).

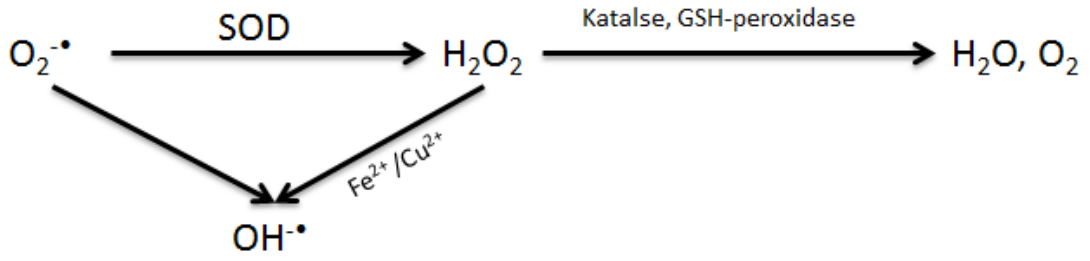

Abb. 8: Beseitigung von ROS durch enzymatische Antioxidation, SOD: Superoxiddismutase, GSH-Peroxidase: Glutathionperoxidase, nach [120]

1.3.1.4 Reparatur

Kommt es durch ROS zu Schäden wie in 1.2.3. beschrieben, so gibt es eine Vielzahl an Enzymsystemen welche diese reparieren sollen. Geschädigte Basen werden beispielsweise durch die *Oxoguanin-Glycosylase* aus der DNA entfernt [134]. Dieses weite Feld von Systemen soll hier nicht weiter ausgeführt werden.

1.3.2 Adaptation

Die Anpassung der Zelle an die erhöhte Sauerstoffkonzentration ist von elementarer Wichtigkeit für ihr weiteres Überleben. So werden Stressproteine in der Zelle hochreguliert.

1.3.2.1 Aktivierung von NF-κB

NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)* ist ein Multiproteinkomplex, welcher als Transkriptionsfaktor für viele Zellantworten während des zellulären Stresses verantwortlich ist. NF-κB kann durch viele verschiedene Stimuli, wie Viren, LPS, Zytokine und diverse andere aktiviert werden [55]. Hierbei spielt das Protein *IκBα (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)* eine wichtige Rolle. Es agiert als Inhibitor von NF-κB und verhindert somit die Bindung dessen an DNA. Bei entsprechenden Stimuli wird IκBα durch die *Proteinkinase C (PKC)* [125] oder der *IκBα-Kinase (IKK)* [79] phosphoryliert (vgl. **Abb. 13**). Dadurch wird es ubiquitiert und somit dem *Proteasom* zugeführt. Daraufhin kommt es zur Freigabe von NF-κB und zur Genexpression durch Bindung dessen an die DNA [106]. Die Genexpression in Folge von NF-κB-Bindung an die DNA kann sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Effekte haben [75].

Für NF-κB existieren zudem Bindungstellen an Promotoren für iNOS [147] und *HO-1* [92].

1.3.2.2 Hämoxygenase 1 (HO-1) und Nrf-2

Häme sind Komplexverbindungen aus *Porphyrinringsystem* und einem zentralen Eisenatom. Sie kommen - in die Tertiärstruktur eingebunden - in diversen *Hämproteinen* vor. Die HO-1 baut Häme zu *Kohlenstoffmonoxid, Biliverdin und Eisen* ab [102] (vgl**. Abb. 9**). *Freie Häme* sind dagegen nicht in die Tertiärstruktur ihrer Hämproteine eingebunden. Sie können durch die Fenton-Reaktion zu freien Radikalen führen [57].

Während des oxidativen Stresses, kommt es vermehrt zu freien Hämen [57]. Die Zelle reagiert darauf, indem sie vermehrt HO-1 exprimiert. Dies wird durch das Protein *Nrf-2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)* reguliert. Normalerweise liegt Nrf-2 an seinen Inhibitor, dem *Keap1* (*Kelch-like ECH-associated protein 1)*, gebunden im Zytoplasma vor. Bei zellulärem Stress entlässt Keap1 Nrf-2 [109] und nachdem dieses selbst durch die Proteinkinase C phosphoryliert wurde [66, 78], bindet es an die sogenannten *antioxidant-response-Elements (ARE)*. Daraufhin kommt es zur Expression von HO-1 (vgl. **Abb.13**). Der Abbau von Hämen wird somit verstärkt [57].

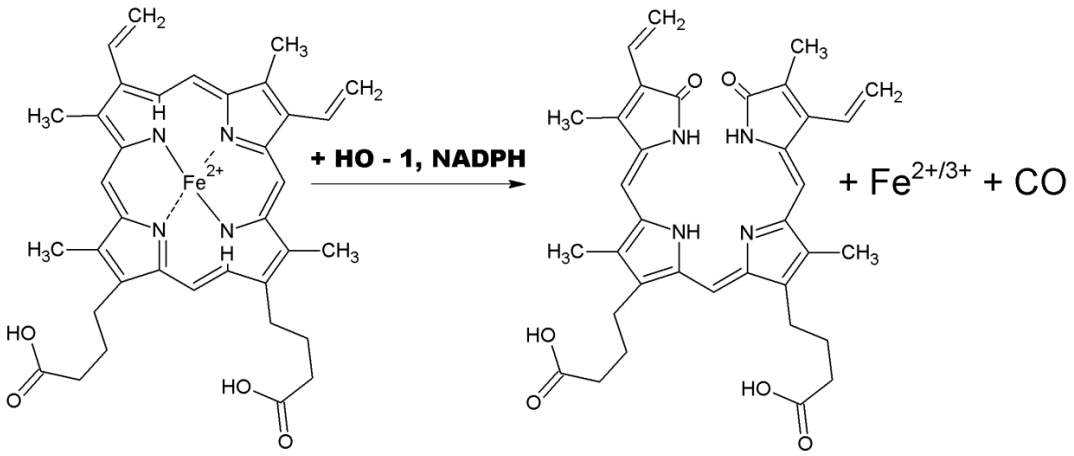

Abb. 9: Abbau von Häm b zu Biliverdin, Kohlenmonoxid und Eisen

1.4 Apoptose und Nekrose

1.4.1 Nekrose

Heutzutage sind zwei Modelle für den Zelltod bekannt; die *Nekrose und die Apoptose.* Nekrose beschreibt den unbeabsichtigten Zelltod durch schwere Verletzung oder Beschädigung der Zelle. Sie ist dadurch charakterisiert, dass der zelluläre Metabolismus derart zusammenbricht, so dass Mitochondrien sowie Zytoplasma anschwellen, es zu ATP-Depletion und Zerstörung der Plasmamembran kommt [88].

1.4.2 Apoptose

Im Gegensatz zur Nekrose wurde 1972 der Begriff der Apoptose [81] eingeführt, der einen regulierten, endogenen Vorgang mit charakteristischer Morphologie beschreibt. Apoptose kann physiologisch oder pathologisch sein [29]. Dabei sind zwei Proteinfamilien das Kernstück des Vorgangs der Apoptose. Zum einen die Familie der *Bcl-2 Proteine*, zum anderen die *Caspasen*.

1.4.2.1 Familie der Bcl-2

Die Familie der *Bcl-2 (B-Cell-Lymphoma 2)* ist in der Evolution gut konserviert und spielt bei der Apoptose eine wichtige Rolle [25]. Benannt wurde sie nach einem *follikulären B-Zell-Lymphom* [6, 142], in dem sie entdeckt wurde. Es existieren *pro-apoptotische (z.B. Bax)* und *anti-apoptotische (z.B. Bcl-xL)* Proteine in dieser Familie. *Cytochrom c* wird freigesetzt, wenn Bax die Permeabilität der *äußeren Mitochondrienmembran (OMM)* erhöht [31, 104]. Bax liegt im Gleichgewicht zwischen Zytosol und der äußeren Mitochondrienmembran. Bei DNA-Schäden und daraus resultierendem zellulären Stress wird Bax durch *p53* hochreguliert. [17]. Bcl-xL ist in der Lage, Bax an der OMM zu binden und in das Zytosol zu verlagern (vgl. **Abb. 10**) [104]. Somit hilft Bcl-xL die OMM zu stabilisieren und die Freisetzung von Cytochrom c zu verhindern [67]. Bcl-xL und Bax können in Verhältnis zueinander gesetzt

werden, was dazu genutzt werden kann die Anfälligkeit der Zelle für Apoptose zu bestimmen [58].

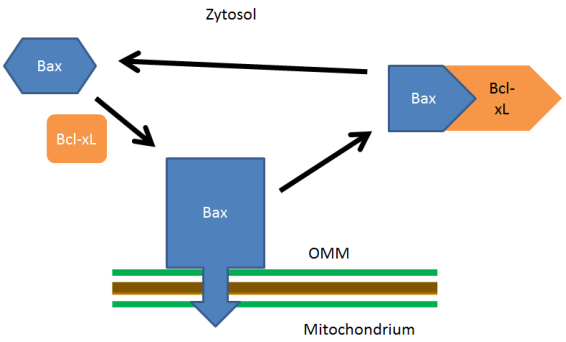

Abb. 10: Gleichgewicht von Bax zwischen äußerer Mitochondrienmembran (OMM) und Zytosol. Bcl-xL bindet das membranständige und überführt es zurück ins Zytosol nach [104]

1.4.2.2 Caspasen

Caspasen sind Cystein-Proteasen welche Peptidbindungen spezifisch C-Terminal von Aspartat schneiden. Der Name leitet sich vom englischen ***c**ysteinyl-**a**spartate **s**pecific **p**rote**ase*** ab. Caspasen bilden *Kaskaden*, welche unterschiedlich aktiviert werden. Dabei werden zwei Wege unterschieden. Der *extrinsische Weg* wird durch Bindung von *Tumor-Nekrose-Faktor* an seinem Rezeptor ausgelöst. Beim *intrinsischen Weg* wird durch pro-apoptotische Proteine die Freisetzung von Cytochrom c an der Mitochondrienmembran aktiviert. Cytochrom c bindet daraufhin *Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1)* und bildet damit das sogenannte *Apoptosom.* Dieses ist in der Lage die *Procaspase 9* zu spalten und in die aktive Form zu überführen. Beide Wege münden in der Spaltung der *Effektorcaspasen* (z.B. Caspase 3, 6 & 7) durch die *Initiatorcaspasen* (z.B. Caspase 8 & 9) [65]. Effektorcaspasen führen zur Spaltung vieler Proteine. Derzeit sind mehr als 280 Proteine bekannt, welche von Caspasen gespalten werden [42] (vgl. **Tabelle 2**). Darunter sind Proteine welche in die Apoptose involviert sind und viele *Membran- und Zytoskelettproteine*. Zusätzlich kommt es durch *limitierte Proteolyse* zur Aktivierung von Zielproteinen. Eines davon ist die der *Inhibitor der Caspase-aktivierte-DNAse (ICAD)*. *Die Caspase-aktivierte-DNAse (CAD)* schneidet die DNA an internukleosomalen Regionen [105]. Dabei wird die DNA in 50-200 kb große Stücke geschnitten, was charakteristisch für Apoptose ist [107].

Tabelle 2: Auswahl an bekannten Caspase-Substrate, ARE: anti-oxidant-Element, ICAD: Inhibitor der CAD: Caspase-aktivierte. DNAse nach [42]

Substrat	Funktion	Effekt durch Spaltung	Konsequenz durch Spaltung
Bax	pro-apoptotisch	unbekannt	unbekannt
Bcl-xL	anti-apoptotisch	inaktiviert	Erzeugung eines pro-apoptotischen Fragments
Procaspasen 1-14	Procaspase	aktiviert	Aktivierung durch limitierte Proteolyse
β-Actin	Zytoskelett	inaktiviert	nicht generell nachgewiesen
Lamin A	Kernmembranprotein	inaktiviert	Kernmembranabbau
Nrf-2	bindet ARE	inaktiviert	vermehrte Bildung des C-terminalen Ende induziert Apoptose
IκBα	Inhibitor von NF-κB	aktiviert	Spaltung bildet einen konstitutiven Inhibitor
ICAD	Inhibitor der CAD	inaktiviert	Spaltung entlässt die CAD

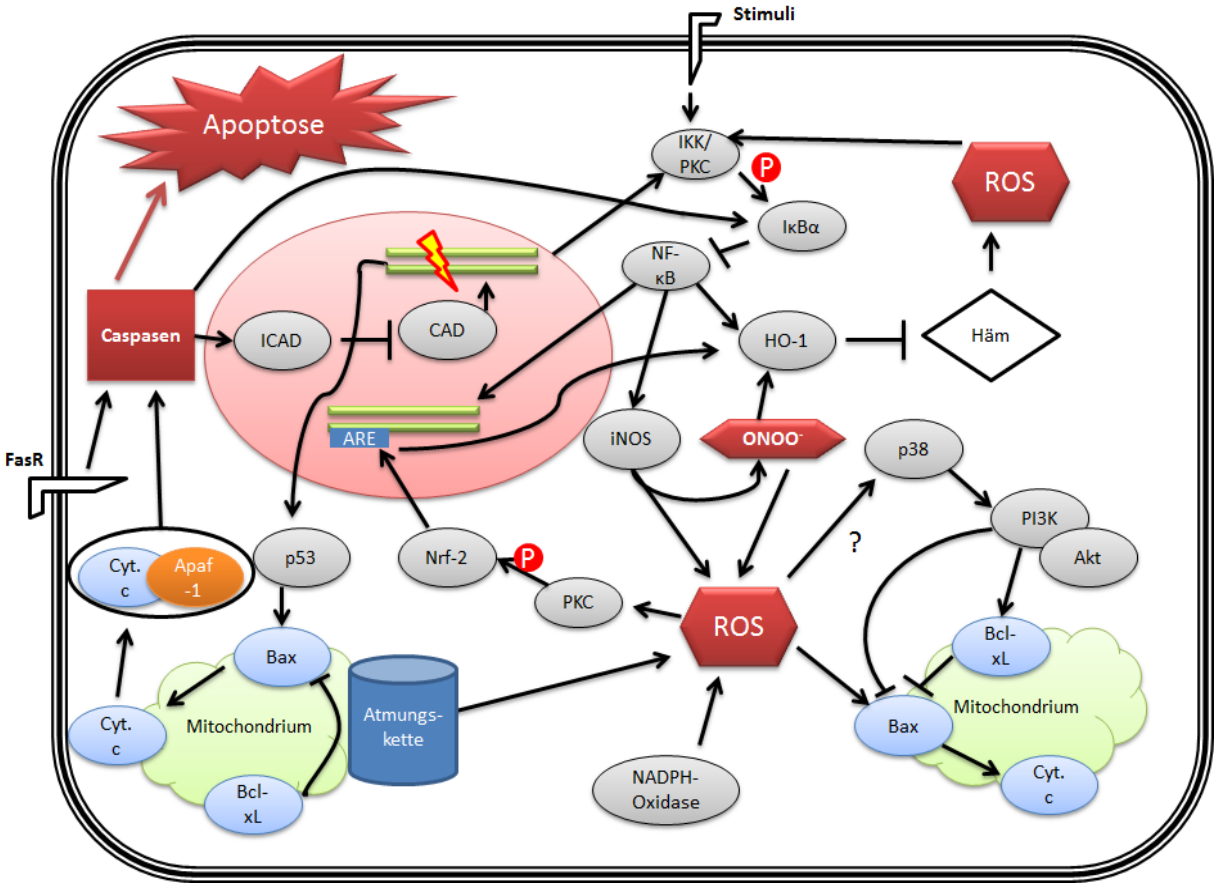

Abb. 11: Zellulären Stress durch ROS, Cyt. c: Cytochrom c, $ONOO^-$: Peroxinitrit, ICAD: Inhibitor der CAD: Caspase-aktivierte Caspase, ARE: antioxidant-response-Element, PKC: Proteinkinase C, IKK: IκBα-Kinase, PI3K: Phopspatidylinositol-3-Kinase, FasR: Todesrezeptor, P: Phosphorylierung, Apaf-1: Apoptotic protease activating factor 1, Akt: Proteinkinase B, ?: Weg wird diskutiert

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Wie in 1.1 beschrieben, kommt der Therapie mit Sauerstoff in der Medizin eine hohe Bedeutung zu. Gerade auf Intensivstationen oder in der Therapie der COPD werden Patienten über lange Zeiträume hohen Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt. Da Sauerstoff *protektive*, aber auch *zerstörerische* Wirkung haben kann, wird in der Literatur diskutiert wie man Sauerstoffgabe einsetzen soll [85, 97].

Alveolarmakrophagen sind Phagozyten, welche in den Lungenalveolen sitzen. Dem ist geschuldet, dass sie, obwohl sie aus der Hämatopoese entstammen, höheren Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt sind, als vergleichbare Zellen im Körper. Zusätzlich zu den hohen Sauerstoffpartialdrücken bilden sie als Phagozyten ROS und sind somit vermutlich mehr oxidativem Stress ausgesetzt als Lungenepithelzellen. In der Literatur sind viele Schäden (siehe 1.2.3.) an Lungengewebe durch (teilweise hyperbare) Hyperoxie beschrieben [2, 21, 86, 122, 140]. Dabei spielen Alveolarmakrophagen eine wichtige Rolle [21], da sie in Homöostase, Immunabwehr, der Antwort auf Fremdsubstanzen und beim sogenannten „tissue remodelling“ [91] erheblichen Einfluss auf die sie umgebende Lunge nehmen.

In dieser Studie sollte der Einfluss von normobarer Hyperoxie ausschließlich auf murine Alveolarmakrophagen untersucht werden. Da Alveolarmakrophagen bei Hyperoxie einen großen Einfluss auf die sie umgebende Lunge - und diese auf sie - ausüben [115], sollte in dieser Arbeit die alleinigen Reaktionen von Alveolarmakrophagen bei Hyperoxie untersucht werden. Durch die *in vitro* Exposition war es wegen der einfachen Handbarkeit der Exposition möglich, diese ohne äußere Einflüsse - wie Zytokinen - zu exponieren.

Bei den hier untersuchten Alveolarmakrophagen beträgt die gewohnte Sauerstoffkonzentration die von normalem Luftsauerstoff, also 21 Prozent. Aus diesem Grund kann normale Luft nicht als Hyperoxiemodell genutzt werden, wie bei anderen Zellarten [53]. Somit wurde ein 95% Sauerstoff, 5% CO_2-Gasgemisch als normobare Atmosphäre gewählt.

Um die Frage zu beantworten, ob Alveolarmakrophagen unter Hyperoxiebedingungen an oxidativem Stress leiden, wurden sie sowohl auf DNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene untersucht.

Primäre DNA-Schäden sollten mittels des Comet-Assays identifiziert werden, während hingegen Veränderungen in der Genexpression über die Methode des Western Blots detektiert wurden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die Proteine IκBα, Nrf-2 und HO-1, um der Adaptation an die Hyperoxie zu untersuchen und Caspase 3, Bax und Bcl-xL als Apoptosemarker.

Weiterhin sollte der nitrosative Stress nachgewiesen werden. Hier diente die iNOS als Marker im Western Blot und Nitrotyrosin als Marker in der Immunzytochemie.

So sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Führt die normobare Hyperoxie zu vermehrten DNA-Schäden in Alveolarmakrophagen?
2. Passen sich Alveolarmakrophagen durch Aktivierung von NF-κB, und Expression von HO-1 und Nrf-2 der normobaren Hyperoxie an?
3. Kommt es im Rahmen der normobaren Hyperoxie zu Veränderungen der Apoptosemarker Bax, Bcl-xL und Caspase 3?
4. Leiden Alveolarmakrophagen unter nitrosativem Stress während normobarer Hyperoxie und spielt die iNOS hierbei eine Rolle?

2. Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Materialien

2.1.1 Laborgeräte

- Blotting Kammer
  Transblot SD — Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Drucker
  Star LC24-200 — Star, Shizuoka, Japan
- Eiswanne
  Eisbad 1-6030 — neoLab, Heidelberg
- Entwicklermaschine
  Protec Optimax 2010 — Protec GmbH & Co. KG, Oberstenfeld
- Expositionskammer
  Eigenbau — Werkstatt der Universität Ulm, Ulm
- Eismaschine
  Scotsman AF80 — Frimont, Mailand, Italien
- Elektrophoresekammer
  Sub-Cell GT Basic — Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Gelkammern
  Mini-Protean II — Bio-Rad, Hercules, CA, USA
  Mini-Protean Tetra — Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Heizblock
  Thermostat 5320 — Eppendorf, Hamburg
- Heizrührer
  RTCbasic — IKA Labortechnik, Staufen

- Inkubationsschrank
  - Heracell 150i — Thermo scientific, Waltham, MA, USA
- Kühlschrank
  - Glass Line — Liebherr, Bulle, Schweiz
- Mikroplattenlesegerät
  - SLT 340 ATTC — SLT Labinstruments, Crailsheim
- Mikroskop
  - Olympus BX41 — Olympus, Tokyo, Japan
  - Olympus CKX41 — Olympus, Tokyo, Japan
  - Olympus U-LH100HG — Olympus, Tokyo, Japan
  - Olympus U-RLF-T — Olympus, Tokyo, Japan
  - Zeiss Axio Imager A1 — Carl Zeiss, Jena
- Mikrowelle
  - Bosch Mikrowellenherd 842C — Robert Bosch GmbH, Gerlingen
- pH-Meter
  - Mettler MP220 — Mettler Toledo, Giessen
- Photometer
  - GeneQuant Pro — ‚*Amersham Pharmacia Biotech,* Uppsala, Schweden
- Pipetten
  - Eppendorf Reference® — Eppendorf, Hamburg
  - Eppendorf Multipette® — Eppendorf, Hamburg
  - Hamiltonpipette #705 — Hamilton Company, Reno, NV, USA
  - Pipetboy acu — Integra Biosciences, Fernwald

- Schneidemaschine
  - Dahle 561 — Dahle, Rödental
- Schüttelgerät
  - Shaker S4 — ELMI, Riga, Lettland
- Spannungsquellen
  - Consort E835 — LTF Labortechnik, Wasserburg/Bodensee
  - Power Pac200 — Bio-Rad, Hercules, CA, USA
  - Power Pac 3000 — Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Sterilbank
  - MSC-Advantage — Thermo scientific, Waltham, MA, USA
- Thermocycler
  - PTC 200 — MJ Research, St. Bruno (Quebec) Canada
- Waage
  - ScalTec SBC31 — ScalTec, Heiligenstadt
- Zellzählgerät
  - Coulter Counter Z2 — Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
- Zentrifugen
  - Centrifuge 5804 R — Eppendorf, Hamburg
  - Megafuge 1.0 R — Thermo scientific, Waltham, MA, USA
  - Centrifuge 5424 R — Eppendorf,Hamburg

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien

- 2-Mercaptoethanol 98% — Sigma-Aldrich, Steinheim
- Acrylamid-Bis — Serva, Heidelberg
- APS — Sigma-Aldrich, Steinheim
- BCIP — Sigma-Aldrich, Steinheim
- Biocoll Seperating Solution — Biochrom AG, Berlin
- Borsäure — J.T. Baker, Deventer, Holland
- Bradford Reagenz Protein Assay — Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Bromphenolblau — Sigma-Aldrich, Steinheim
- BSA — PAA, Pasching
- CMH — Noxygen Science Transfer
- Complete — Roche, Basel, Schweiz
- Dako REAL™ Detection System — Dako, Hamburg
- DMEM — Invitrogen Cooperation, Paisley, Schottland
- DMSO — Merck, Darmstadt
- DTT — Sigma-Aldrich, Steinheim
- EGTA — Sigma-Aldrich, Steinheim
- Ethanol 99% — Merck Eurolabs, Ulm
- Ethanol — Sigma-Aldrich, Steinheim
- Ethidiumbromid — Carl Roth, Karlsruhe
- FCS — PAA, Pasching
- Formaldehyd — Otto Fischar, Saarbrücken
- Gasgemisch 98% O_2, 2% CO_2 — MTI Industriegase, Ulm
- Gentamicin — Merk Serono, Darmstadt
- GlutaMAX — Invitrogen Cooperation, Paisley, Schottland
- Glycerin — Carl Roth, Karlsruhe
- Glycerol — Sigma-Aldrich, Steinheim
- Glycerolphosphat — Sigma-Aldrich, Steinheim
- Glycin — Sigma-Aldrich, Steinheim

▪ Iso-Septol	Apotheke Universität Ulm
▪ Leupetitin	Roche, Basel, Schweiz
▪ LMP-Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ LumiGLO®	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
▪ MEEO-Agarose	Merck, Darmstadt
▪ MEM NEAA 100X	Invitrogen Cooperation, Paisley, Schottland
▪ Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
▪ Na_2EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Natriumbikarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Natriumnitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Natronlauge 1M	Merck, Darmstadt
▪ Na-Vanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ NBT	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ NP 40	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Pancou S®	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ PBS-Puffer	Invitrogen Cooperation, Paisley, Schottland
▪ PNPP	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Salzsäure 1M	Merck, Darmstadt
▪ Salzsäure rauchend 37%	Merck, Darmstadt
▪ Sauerstoff	MTI Industriegase, Ulm
▪ SDS	Carl Roth, Karlsruhe
▪ Sterilwasser	Fresenius, Bad Homburg
▪ Stickstoff (flüssig)	MTI Industriegase, Ulm
▪ Stickstoff (gasförmig)	MTI Industriegase, Ulm
▪ SuperSignal® Enhancer	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
▪ SuperSignal® Peroxide	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
▪ TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim

- Tris-Base — Sigma-Aldrich, Steinheim
- Triton X-100 — Sigma-Aldrich, Steinheim
- Tryphan Blau 0,4% — Sigma-Aldrich, Steinheim
- TWEEN® 20 — Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.3 Antikörper

- 3-Nitrotyrosin #AB5411 — Millipore, Schwalbach
- Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody #7074 — Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
- AP-Antikörper DAKO REAL® — Dako, Hamburg
- Bax Antibody #2772 rabbit — Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
- Bcl-xL-Antikörper 54H6 rabbit mAb — Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
- Brückenantikörper DAKO REAL® — Dako, Hamburg
- Cleaved Caspase 3 (Asp175) #9661 rabbit — Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
- Goat anti rabbit IgG-HRP Sc 2004 — Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
- HO-1 Antibody #1922 rabbit — Epitomics, Burlingame, CA, USA
- IκBα Antibody sc 3714 rabbit — Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
- Polyclonal Rabbit Anti-iNOS #610333 — BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA
- Nrf-2 Antibody #8882 — Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

2.1.4 Sonstige Verbrauchsmaterialien

▪ 15 mL Falcon	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
▪ 50 mL Falcon	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
▪ Bechergläser	Schott Glas, Mainz
▪ Zellschaber	Greiner Bio-One**,** Kremsmünster, Österreich
▪ Chromatographiepapier 3mm Chr	Whatman, Maidstone, Kent, GB
▪ Combitips 10 mL	Eppendorf, Hamburg
▪ Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
▪ Einmal-Pasteurpipetten 3,5 mL	Sarstedt, Nürmbrecht
▪ Erlenmeyerkolben	Schott Glas, Mainz
▪ Glastrichter	Schott Glas, Mainz
▪ Klarsichtfolie	Saropack, Rorschach, Schweiz
▪ Lab-Tek™ 177399	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
▪ Micro Test Tubes 1,5 mL (Eppis)	Eppendorf, Hamburg
▪ Micro Test Tubes 2 mL (Eppis)	Eppendorf, Hamburg
▪ Multiply µStrip® 4er	Sarstedt, Nümbrecht
▪ Nitrozellulose	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
▪ Objektträger mit Mattrand	Marienfeld, Lauda-Königshofen
▪ Papiertücher	Kimberly-Clark, Dallas, USA
▪ Parafilm® M	Brand, Wertheim
▪ Petrischalen	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
▪ Probengefäße 20 mL	Sarstedt, Nürmbrecht
▪ PVDF Membranen	Millipore, Schwalbach
▪ Röntgenfilme Cronex 5 18x24	AGFA, Mortsel, Belgien
▪ Spritzen	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
▪ Stripette®	Costar, Corning, NY, USA
▪ Zellkulturflaschen	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.5 Zelllinie

AMJ2-C11 macrophage cell lines	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Die hier verwendeten Zellen wurden durch Infektion mit dem onkogentragenden (v-raf und v-myc) Retrovirus J2 immortalisiert. Diese Onkogene könnten natürlich in den Zellmetabolismus eingreifen. Allerdings wurde die Zelllinie in vielen Studien erfolgreich untersucht, und kein wesentlicher Unterschied zu anderen Zellen festgestellt [11, 57, 66, 99].

2.1.6 Software

▪ Comet Assay II 2.11	Perceptive Instruments, Haverhill, UK
▪ Excel 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA
▪ Word 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA
▪ IBM® SPSS® Statistics v.20	IBM Armonk, NY, USA
▪ ImageJ 1.45	National Institutes of Health,
Bethesda,	MD, USA
▪ AxioVision (Version 4.8)	Carl Zeiss, Jena

2.2 Häufig verwendete Materialien

2.2.1 Zellmedium

- 10% FCS
- 1% GlutaMAX™
- 1% MEM NEAA 100X
- Gentamicin

  In 1x DMEM mischen

2.2.2 Medien, Standardlösungen und Puffer für den Comet Assay

2.2.2.1 Lyse-Stammlösung

- 250mM NaCl,
- 10mM Na_2EDTA,
- 1mM TRIS-Base,
  In ddH_2O, pH 8, 4°C

2.2.2.2 Alkali-Elektrophoresepuffer

- NaOH: 300 mM
- Na_2EDTA: 1 mM
  In ddH_2O

2.2.2.3 Neutralisationspuffer

- Tris-Base: 400 mM
  In ddH_2O

2.2.2.4 Färbelösung

- Ethidiumbromid: 20 µg/ml

2.2.2.5 LMP-Agarose

- LMP-Agarose: 5 mg/ml
  In PBS

2.2.3 Objektträger

Die Objektträger wurden mit 1,5% MEEO-Agarose in PBS (60°C) beschichtet und 48h bei RT getrocknet. Dunkel und trocken konnten sie max. 6 Monate bei RT gelagert werden.

2.2.4 Medien, Standardlösungen und Puffer für Western Blot

2.2.4.1 Sample Puffer nach Lämmli 2x

- 208 mMol SDS
- 1 M TRIS/HCl pH 6,8
- 20% Glycerol
- 8% 2-Mercaptoethanol 98%
- 0,05% Bromphenolblau

  In Aqua dest.

2.2.4.2 Separating Gel Puffer 4x

- 1,5 M TRIS-Base
- 0,4% SDS

  In Aqua dest., mit HCl 10 N auf pH 8,8 einstellen

2.2.4.3 Stacking Gel Puffer 4x

- 0,5 M TRIS-Base
- 0,4% SDS

  In Aqua dest., mit HCl 10N auf pH 6,8 einstellen

2.2.4.4 Laufpuffer 10x

- 1,9 M Glycin
- 250 mM TRIS-Base
- 35 mMol SDS

  In Aqua dest., mit HCl auf pH 8,8 einstellen

2.2.4.5 TRIS bufferd Saline (TBS) 10x

- 200 mM TRIS-Base
- 1,37 M NaCl

  in Aqua dest., mit HCl auf pH 7,6 einstellen

2.2.4.6 Stacking Gel 4,5 % für 6 Gele

- 5 mL Stacking Gel Puffer
- 3 mL Acrylamid/Bis 29:1, 40% w/v
- 11,78 mL ddH_2O
- 200 µL APS
- 20 µl TEMED

2.2.4.7 Separating Gele

Tabelle 3: Herstellung von Gelen verschiedener Acrylamidkonzentrationen für Western Blot

	5%	7,5%	10%	15%
Running Gel Puffer 4x	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Acrylamid/Bis 29:1, 40% w/v	7 mL	10 mL	13,3 mL	20 mL
ddH_2O	22,78 mL	19,78 mL	16,48 mL	9,78 mL
TEMED	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
10% APS	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL

2.2.4.8 Blotto B Blocking Puffer

- 1% w/v fettfreie Milchpulver
- 1% v/w BSA
- 0,1 % Tween-20

  In 1x TBS

2.2.4.9 Milch Blocking Puffer

- 0,1% Tween-20
- 5% w/v fettfreie Trockenmilch
- In 1x TBS

2.3 Methoden

2.3.1 Comet Assay

Der alkalische Comet Assay wird auch *Einzelzellgelelektrophorese genannt (SCGE).* Es ist ein einfaches und schnelles Verfahren um den Nachweis von *Einzel- und Doppelstrangbrüchen* zu erbringen [131]. Dabei werden Einzelstrangbrüche als *alkalilabile Stellen* in Doppelstrangbrüche überführt und entspiralisiert [39]. Diese entstehen beispielsweise, wenn oxidierte Basen bei Reparaturvorgängen entfernt werden. Somit können oxidative Schäden an DNA mit Hilfe des Comet Assays nachgewiesen werden [144]. Dabei werden wenige Zellen in eine Gelsuspension gebracht und auf einem Objektträger ausgestrichen. Die Zellen werden anschließend lysiert und in alkalischem Puffer einer horizontalen Elektrophorese unterzogen. Dabei wandern die Bruchstücke der DNA vom Zellkern Richtung Anode. Dies stellt sich unter dem Mikroskop, nach anfärben mit Ethidiumbromid, als *„Komet"* dar. Die Bruchstücke erscheinen hierbei als *„Schweif"* (vgl. **Abb. 12**).

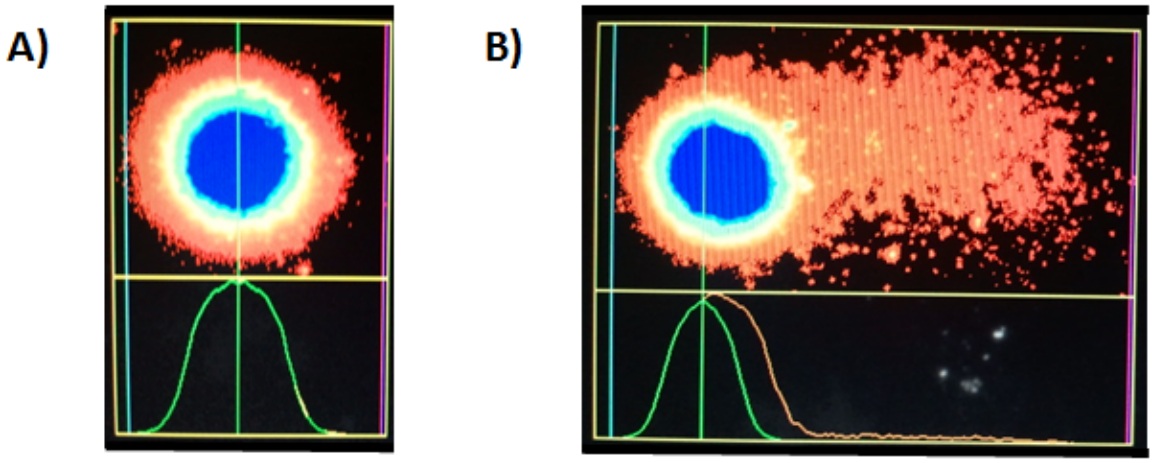

Abb. 12: **A)** Zellkern mit wenigen DNA-Schäden **B)** Zellkern mit vielen DNA-Schäden (Komet mit Schweif)

2.3.1.1 Zellkultur

Die Makrophagen wurden alle drei bis vier Tage bei 80%-90% Konfluenz in Zellmedium (10% FCS, 1% GlutaMAX, 1% MEM NEAA 100X, Gentamicin) in neue Zellkulturflaschen (Nunclon™Δ Surface R) passagiert. Die Zellen wurden bei 37°C, 21% O_2 und 5% CO_2 im Inkubationsschrank gezüchtet. 24h vor dem Experiment wurden sie entweder dort belassen (Kontrolle) oder bei 95% O_2 und 5% CO_2, 37°C (Intervention) exponiert

2.3.1.2 Expositonen

Bei der Exposition wird ein 7,2 Liter (vgl. **Abb. 13**) fassendes Expositionsgefäß mit Sauerstoff geflutet und anschließend mit 360 mL Kohlenstoffdioxid versetzt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass 360mL Sauerstoff verdrängt werden können. Auf eine gute Durchmischung der Gase muss Wert gelegt werden. Die 95%-Sauerstoff-5%-CO_2 Atmosphäre wurde mit einem Blutgasanalysegerät sporadisch überprüft.

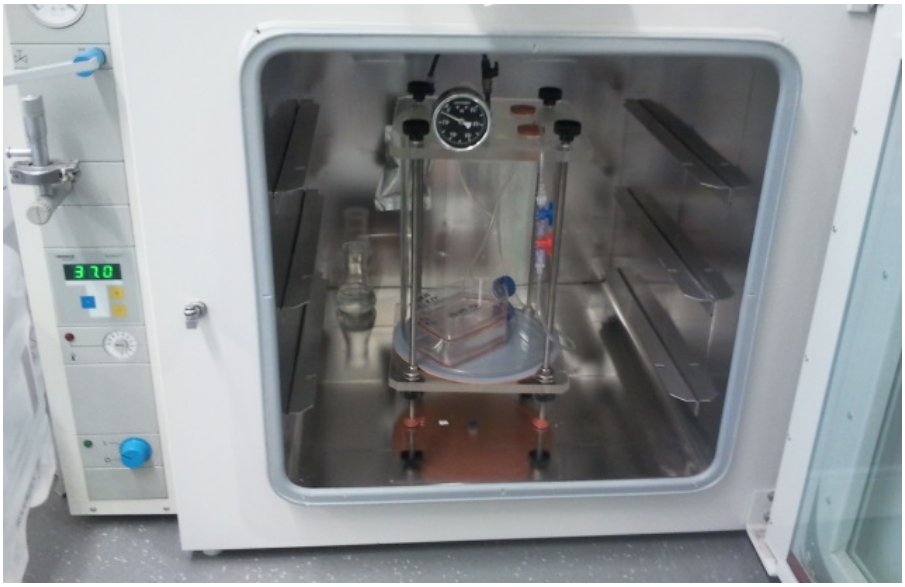

Abb. 13: Expositionsgefäß mit Zellkulturflaschen in Wärmeschrank

Es fanden 40 Expositionen an unterschiedlichen Tagen statt. Hierbei wurden Zellkulturflaschen für den Comet-Assay-Versuch wie in 2.3.1.1. beschrieben exponiert. Kontrollen wurden jeweils parallel dazu in Luft-5%-CO_2-Atmosphäre exponiert. 24 Stunden später wurden diese wie in 2.3.1.3 beschrieben verarbeitet.

2.3.1.3 Aufarbeitung der Zellen und Lyse

Zum Ernten der Makrophagen wurde mit einem Spatel sorgfältig der Flaschenboden abgeschabt und die Zellsuspension 7 min bei 115 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit PBS (4°C) gewaschen und im nächsten Schritt in 10 mL PBS erneut resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 15µL in 125 µL 37°C LMP-Agarose (0,5% in PBS) suspendiert. Davon wurden 130µL auf vorbereitete Objektträger (1,5% MEEO-Agarose in PBS beschichtet) aufgebracht und abgedeckelt. Nach Erstarren (4 min bei 4°C) wird das Deckglas, senkrecht zur späteren Laufrichtung in der Elektrophorese, abgezogen. Die nun beladenen Objektträger werden in Lyselösung (1% Triton X-100, 10% DMSO, 250mM NaCl, 10mM Na_2EDTA, 1mM TRIS-Base, pH 8, 4°C) für mindestens 12 h, maximal 48h inkubiert (4°C). Dabei ist darauf Wert zu legen, die Proben nicht zu lange dem Licht auszusetzen, um weitere DNA-Schäden zu vermeiden.

2.3.1.4 Alkalidenaturierung

Nach der Lyse, werden die Objektträger horizontal in eine Elektrophoresekammer - welche im Eiswasser steht - gelegt. Anschließend wird die Elektrophoresekammer mit Alkali-Elektrophoresepuffer (300mM NaOH, 1M Na_2EDTA, 4°C, pH ≥13) so weit gefüllt, dass die Objektträger bedeckt sind. Die Proben werden unter Lichtabschluss 40 Minuten inkubiert. Alkalilabile Stellen werden hierbei in DNA-Strangbrüche überführt und die DNA entspiralisiert [39].

Dabei wurde darauf geachtet, dass immer 12 Objektträger in der Elektrophoresekammer lagen. Waren nicht genügend Proben vorhanden, wurden die übrigen Plätze mit leeren Objektträgern belegt.

2.3.1.5 Elektrophorese und Trocknung

Im selben Alkali-Elektrophoresepuffer wurde anschließend eine Elektrophorese (25 min, 25V, 300mA) unter Lichtabschluss durchgeführt.

Nach Abschluss der Elektrophorese werden die Proben dreimal für 5 Minuten mit Neutralisationspuffer (TRIS-Base: 400 mM, pH 7,8, 4 °C) bedeckt. Anschließend wurden die Präparate mit dH_2O (RT) abgespült und in Ethanol (99,8%, RT) 5 Minuten dehydratisiert. Die so präparierten Objektträger wurden mindestens für 2 Stunden unter Lichtabschluss getrocknet.

2.3.1.6 Anfärben und Auswerten der Proben

Die Proben wurden mit 50 µL Ethidiumbromid-Färbelösung (20µg/µL) bedeckt und mit einem Deckglas eingedeckelt. Daraufhin wurde die Probe unter dem Floureszenzmikroskop (400-facher Vergrößerung, Anregungswellenlänge: 515 nm – 560 nm, Sperrfilter: bei 590 nm, CCD-Kamera, Software: Comet Assay II V2.11) ausgewertet.Die Auswertung erfolgte verblindet und von nur einer Person.

2.3.1.7 Statistik

Die Software Comet Assay II V2.11 erhebt folgende Parameter

- Länge des Kometenschweifes: *Tail Length*
- Verteilung der Fluoreszenzintensität auf Kopf und Schweif
- das Produkt von *Tail Length* und Fluoreszenzintensität im Schweif und Kopf: das *Tail Moment*

Dabei wurde das Tailmoment der Proben in eine Excel-Tabell übertragen und die Daten entblindet. Es wurden Median, 25%-Perzentile, 75%-Perzentile, Minimum und Maximum bestimmt. Durch den Kolmogorov-Smirnov-Test wurde ausgeschlossen, dass es sich um normalverteilte Ergebnisse handelt. Nach Mann-Whitney-U-Test wurde untersucht, ob sich die DNA-Schäden durch verschiedenen Expositionen signifikant voneinander unterscheiden. Als Signifikanzniveau wurde $p<0,05$ gewählt.

Ausreißer sind Werte, welche außerhalb der Antennen liegen. Extremwerte sind Werte die mindestens Faktor 3 größer sind als die gesammte Höhe der Box.

Bei der Auswertung und Berechnung der Ergebnisse, sowie der graphischen Darstellung wurde auf das Programm IBM Statistics SPSS® v.20 zurückgegriffen.

2.3.2 Semiquantitativer Western Blot

Beim semiquantitativen Western Blot werden Proben mit gleichen Proteinkonzentrationen auf ein SDS-Gel geladen und somit entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Membran werden diese mit primären Antikörpern - welche spezifisch an dem gesuchten Protein binden - inkubiert. Mit Hilfe eines zweiten Antikörpers - welcher mit der Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist – wird der primäre Antikörper gebunden. Bei Versetzen mit einem Chemolumiszenz-Substrat wird dieses durch die HRP gespalten und es ist möglich die Chemolumiszenz auf einem Film abzubilden. Durch die Messung der Bandenintensität, kann man auf die Menge an Protein schließen.

2.3.2.1 Zellkultur

Siehe 2.3.1.1

2.3.2.2 Expositionen

Für die Messung der unterschiedlichen Proteine wurden 3 Expositionen mit jeweils 2 Zellkulturflaschen wie in 2.3.1.2 beschrieben exponiert. Kontrollen wurden jeweils parallel in Brutschränken exponiert. Die Zellen aus gleicher Exposition wurden zusammengefasst, um genügend Proteinkonzentration zu erhalten.

2.3.2.3 Aufarbeitung der Zellen und Lyse

Nach Herausnahme aus der Exposition wurden die Zellkulturflaschen sofort auf Eis gestellt, um weitere metabolische Prozesse zu verlangsamen.

Zum Ernten der Makrophagen wurde mit einem Spatel sorgfältig der Flaschenboden abgeschabt und die Zellsuspension bei 115 g, 7 min bei 4 °C zentrifugiert.

Das Pellet wurde zweimal mit 50 mL PBS (4°C) gewaschen und anschließend in 250 µL Lysepuffer (250 mM NaCl, 50 mM TRIS/HCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,5 % NP40, 10% Glycerol, 1 Tab Complete, pH 7,5) 30 Minuten lysiert.

Anschließend wurde die Lyse 30 Minuten bei 20570 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Die so erhaltenen Proben wurden mit EMSA-Puffer (nach Baumann: 50 mM NaCl, 10 mM TRIS/HCl, 1 mM DTT, 20% Glycerol, 10 µg BSA) so verdünnt, dass ca. 4 µg/µL (±10% Toleranz) Gesamtproteinkonzentration eingestellt wurde (vgl. **Tabelle 4**)

Gemessen wurde diese Proteinkonzentration mittels Proteinbestimmung nach Bradford bei 595 nm. Im Nachhinein wurde ein Teil der Probenmenge mit 2x Probenpuffer gekocht. Ein weiterer Teil wurde 1:1 mit EMSA Puffer verdünnt. So erhielt man Proteinkonzentrationen von 2 µg/µL und 1 µg/µL für Westernblots (vgl. **Tabelle 5**).

Tabelle 4: Gesamtproteinkonzentration der einzelnen Proben in µg/µL, bestimmt nach Bradford bei 595 nm

Probe	Gesamtproteinkonzentration µg/µL
Kontrolle 9	4,22
Kontrolle 7	3,92
O_2 Probe 1	4,22
Kontrolle 5	3,92
O_2 Probe 7	4,13
Kontrolle 8	4,17
O_2 Probe 8	3,73

2.3.2.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde mit der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Lämmli durchgeführt. Für den Nachweis verschiedener Proteine wurden unterschiedliche Gele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen gegossen (siehe **Tabellen 3&5**).

Die Elektrophorese wurde bei 5%-Gelen nach Standartprotokoll (15 min 90V, 30 min 180 V) durchgeführt. Bei höherprozentigen Gelen wurde das Programm noch einmal gestarten, bis die gewünschte Auftrennung erreicht war.

2.3.2.5 Semi-dry-Blotting

Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 2 Minuten in Transfer Puffer (25mM TRIS-Base, 0,2 M Glycin, 20 % Methanol, pH 8,5) inkubiert. Danach wurden sie auf die Blotting Membran zwischen mit Transfer Puffer getränktem Filterpapier gelegt. Der Elektrotransfer fand bei 20 V für eine Stunde statt.

2.3.2.6 Anfärben mit Pancou S:

Zum Überprüfen, ob der Elektrotransfer positiv war, wurden die Blottingmembranen mit PancouS® 1 Minute angefärbt. Im Anschluss wurden die Membranen für 5 Minuten in 25mL 1x TBS (137 mM NaCl, 20 mM TRIS-Base, pH 7,6) bei Raumtemperatur gewaschen.

2.3.2.7 Membranblockieren und Antikörper Inkubation:

Die Membranen wurden für eine Stunde in 25 mL proteinspezifischem Blocking Puffer (siehe **Tabelle 5**) inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen 3 mal für 5 Minuten mit TBS/T (1x TBS, 0,1% Tween-20, 4 °C) gewaschen.

Über Nacht wurden die Membranen in 10 mL mit spezifischem Antikörper (vgl. **Tabelle 5**) versetztem Erstantikörperverdünnungsspuffer (1x TBS, 0,1% Tween-20, 5% BSA, 4°C) bei 4 °C unter ständigem Schwenken inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen erneut dreimal für 5 Minuten mit 15 mL TBS/T gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit 10 mL Zweitantikörperlösung (proteinspezifischer Blocking Puffer, spezifischer Zweitantikörper, siehe **Tabelle 5**) versetzt und 1 Stunde unter ständigem Schwenken bei RT inkubiert.

Nach der Zweitantikörperinkubation wurden die Membranen nochmals dreimal für 5 Minuten mit 15 mL TBS/T und einmal mit 15 mL 1xTBS gewaschen.

Tabelle 5: Versuchsprotokoll für verschiedene Proteine beim Western-Blot. AAK: Acrylamidkonzentration, BP: Blotting Puffer, EL: Entwicklerlösung, PK: Positivkontrolle, LAM: Alveolarmakrophage, LPS: Lipopolysaccharid, Sta: Staurosporin

Protein	Proteingröße	Proteinmenge	AAK	Blotting Membran	BP	Primär Antikörper	Sekundär Anti-körper	EL	PK
iNOS	130 kD	20 µg	5%	Nitro-cellulose	Milch 5%	BD Transduction 610333, (1:1000)	Cell signaling #7074 (1:2000)	Lumi GLO®	LAM LPS
Nrf-2	98 kD	20 µg	7,5%	Nitro-cellulose	Blotto B	Cell Signaling D1C9 #8882 rabbit, (1:1000)	Santa Cruz Sc 2004 (1:15.000)	Super Signal®	LAM LPS
IκBα	35-41 kD	10 µg	10%	Nitro-cellulose	Milch 5%	Santa Cruz Sc 3714 rabbit (1:3000)	Santa Cruz Sc 2004 (1:15.000)	Super Signal®	LAM LPS
Bcl-xL	30 kD	10 µg	10%	Nitro-cellulose	Milch 5%	Cell Signaling 54H6 rabbit #2764, (1:4000)	Santa Cruz Sc 2004 (1:15.000)	Super Signal®	LAM LPS
HO-1	32 kD	20 µg	10%	Nitro-cellulose	Blotto B	Epitomics #1922-1 rabbit (1:1500)	Santa Cruz Sc 2004 (1:15.000)	Super Signal®	
Caspase 3	17, 19 kD	20 µg	15%	PVDF	Blotto B	Cell Signaling #9661 rabbit (1:10.000)	Santa Cruz Sc 2004 (1:15.000)	Super Signal®	LAM Sta
Bax	20 kD	20 µg	15%	Nitro-cellulose	Blotto B	Cell Signaling #2772 rabbit (1:1000)	Santa Cruz Sc 2004 (1:15.000)	Super Signal®	LAM LPS

2.3.2.8 Proteindetektion mittels LumiGLO®

Die Membranen wurden mit LumiGLO®-Entwicklungslösung (0,5 mL 20x LumiGLO®, 0,5 mL 20x Peroxid, 9 mL ddH_20, Menge pro Membran) 1 Minute bei Raumtemperatur auf dem Schwenker inkubiert.

2.3.2.9 Proteindetektion mittels SuperSignal®

Die Membranen werden mit SuperSignal®-Entwicklungslösung (0,5 mL SuperSignal Peroxide, 0,5 mL Supersignal Lumilol/Enhancer Lösung, Menge pro Membran) 5 Minuten auf einer Glasplatte inkubiert. Anschließend wurden sie kurz in dd H_20 gewaschen.

2.3.2.10 Entwickeln

Die Membranen wurden in Plastikfolie verpackt und mit Röntgenfilm in Filmkasetten entwickelt. Beim Entwickeln der Filme wurde darauf Wert gelegt, dass die Bandenintensität optimal für eine exakte Auswertung war. Es wurde je nach Stärke der Chemolumiszenz und der Proteinmenge auf die optimale Entwicklungszeit geachtet.

2.3.2.11 Auswertung und Statistik

Die Röntgenfilme wurden bei 600 dpi eingescannt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Image J (Version 1.45s). Hierfür wurde das Bild auf 8-bit Größe formatiert und invertiert. Die Skala wurde bei unit of Length auf Pixel gestellt. Gemessen wurde die Integrated Density, was der Dichte des durch Belichtung verfärbten Röntgenfilms entspricht. Um der Proteinmenge entsprechende Quantifizierung zu erhalten, wurde eine standardisierte Positivkontrolle auf dem gleichen Gel laufen gelassen und gemessen. Auf diese Proben wurden die Bandenstärken bezogen.

Die gemessene Integrated Density wurde in eine Excell Tabelle übertragen. Da die Experimente mehrfach wiederholt wurden, wurde durch die auf den Gelen geladene Positivkontrolle oder Bezugskontrolle geteilt, um eine vergleichbare relative

Integrated Density zu erhalten. Diese Werte wurden im Ergebnissteil äquivalent zur Proteinmenge im Lysat gesehn. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurden die Werte auf Signifikanz geprüft und mit dem Programm IBM® SPSS® Statistics v.20 in Graphiken visualisiert. Als Signifikanzniveau wurde $p<0,05$ gewählt.

2.3.3 Immunzytochemie

Bei der Immunzytochemie nach der *APAAP-Methode. (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) nach Cordell et al* [28] werden Zellen auf einen Objektträger aufgebracht und mit Formaldehyd fixiert. Das gesuchte Protein wird mit Hilfe eines Primärantikörpers besetzt, an welchem ein Sekundärantikörper bindet. Diese beiden Antikörper bilden mit dem Tertiärantikörper, der mit einer *Alkalischen Phosphatase (AP)* konjugiert ist, einen Komplex. In dieser Arbeit wurde hierfür das Dako REAL™ Detection System verwendet. Dabei wird die endogene AP mit *Levamisole* blockiert. Zur Färbung wird ein rotes Chromogen von Dako REAL™ hinzugegeben, welches von der konjugierten AP gespalten wird. Mit Hämatoxylin werden die Zellen danach gegengefärbt. Daraufhin lässt sich der Objektträger densitometrisch auswerten.

2.3.3.1 Zellkultur

Siehe 2.3.1.1

2.3.3.2 Expositionen

Für die Messung des 3-Nitrotyrosins wurden an 2 unterschiedlichen Tagen 2 Zellkulturflaschen wie in 2.3.1.2 beschrieben exponiert. Kontrollen wurden jeweils parallel bei Luft-5%-CO_2 exponiert.

2.3.3.3 Aufarbeitung der Zellen

Nach Herausnahme aus der Expositionskammer wurden die Zellkulturflaschen sofort auf Eis gestellt, um weitere metabolische Prozesse zu verlangsamen. Zum Ernten der Makrophagen wurde mit einem Spatel sorgfältig der Flaschenboden abgekratzt und die Zellsuspension bei 115 g, 7 min bei 4 °C zentrifugiert.

Das Pellet wurde zweimal mit 50 mL PBS (4°C) gewaschen und im nächsten Schritt in 10 mL PBS erneut resuspendiert.

2.3.3.4 Fixierung

Von der Zellsuspension wurde 0,5 mL in jede Kammer des Lab-Tek™ Chamber Slide™ Systems gegeben und die Zellen sollten sich in 30 min bei 37°C setzen. Anschließend wurden sie für 20 min mit Formaldehyd (3,5 %) fixiert. Anschließend trockneten die Objektträger über Nacht an der Luft bei RT.

2.3.3.5 Lyse und APAAP-Methode

Die Zellen wurden rehydriert und 20 min mit Tweenlyse (0,3% Tween 20 in PBS, pH 8, RT in TBS) lysiert. Daraufhin wurde Dako REAL®

normal goat serum für weitere 30 min hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit TBS gewaschen und mit Antikörper gegen 3-Nitrotyrosin (1:200 in TBS, pH 8, RT) für 1 h bei RT inkubiert. APAAP-Methode siehe Dako REAL® Firmen-Protokoll. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (30 s).

2.3.3.6 Dehydratation und Eindeckeln

Die Objektträger wurden in verschieden Konzentrationen Ethanol (70, 90, 100%) und zweimal in Xylol (100%) dehydratiert und mit Klebstoff eingedeckelt.

2.3.3.7 Auswertung und Statistik

Es wurden von jeder Zellkultur in zwei Kammern Zellen fixiert. Von jeder Kammer wurden drei zufällige Areale vermessen. Die Proben wurden mittels Mikroskop (Zeiss Axio Imager A1) bei 40-facher Vergrößerung visualisiert. Die Zellen wurden einzeln betrachtet die Farbintensität densitometrisch mit dem Programm AxioVision (Version 4.8) gemessen.

Die einzelnen densitometrisch gemessenen Rotfärbungen wurden als Werte notiert und mit dem Mann-Whitney-U-Test wurden diese auf Signifikanz geprüft. Mit dem Programm IBM® SPSS® Statistics v.20 wurde dies in einer Graphik visualisiert. Als Signifikanzniveau wurde $p<0,05$ gewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Hyperoxie auf DNA-Schäden

In Abbildung 14 ist die DNA-Migration der Expositionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe dargestellt. Hierbei wurde der Comet-Assay als Untersuchungsmethode angewandt. Die Abbildung zeigt, dass Exposition zu einer deutlichen Steigerung der Tailmomente führte. Dabei konnte mit dem Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied ($p< 0,001$) zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. 24 h Exposition in normobarer Hyperoxie führt zu vermehrten DNA-Schäden.

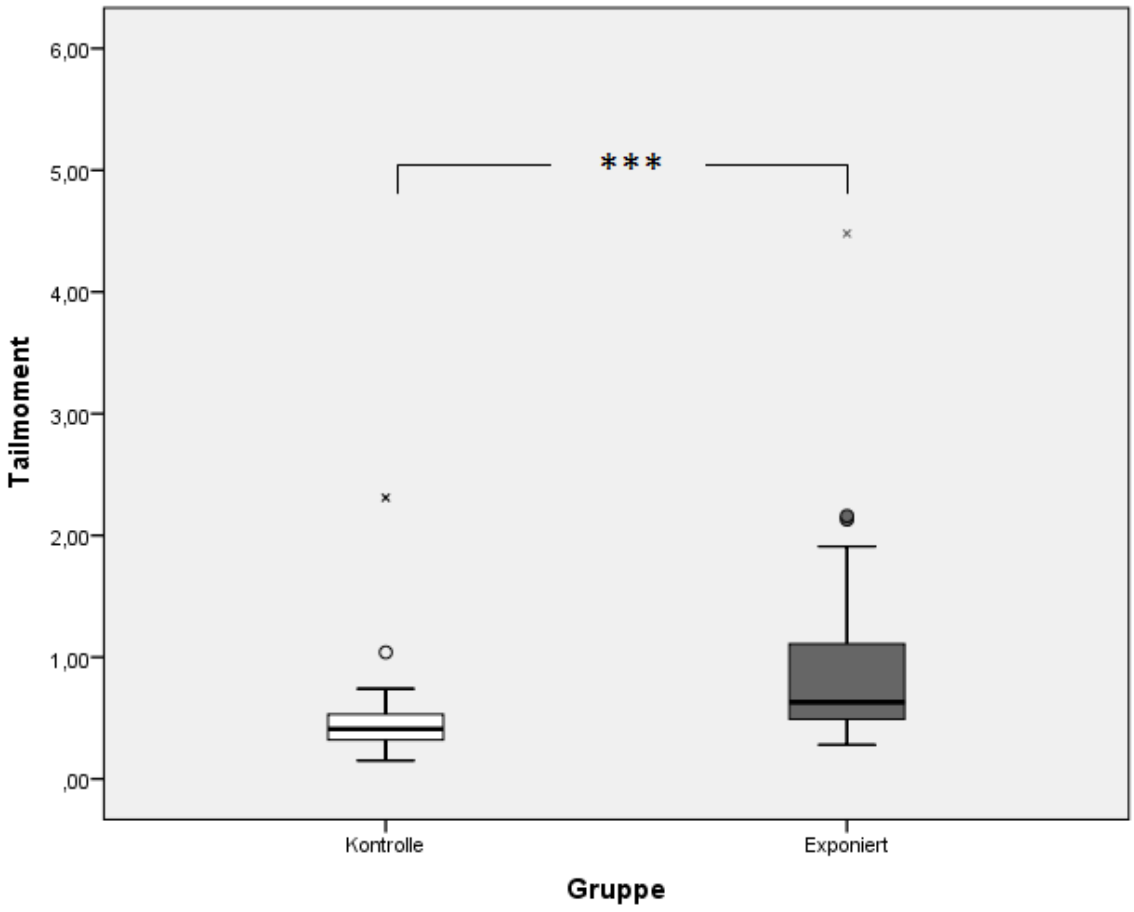

Abb. 14: Darstellung der DNA-Schäden nach 24h Sauerstoffexposition (n=33) und Normalatmosphäre als Kontrolle (n=29). Untersuchung mit Hilfe des Comet Assays. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum. ○: Ausreißer, x: Extreme Werte, *** p<0,001, (Mann-Whitney U Test)

3.2 Westernblot

3.2.1 Einfluss der Hyperoxie auf Proteine der Adaptation

3.2.1.1 Einfluss der Hyperoxie auf IκBα

Abbildung 15 zeigt die Quantifizierung von IκBα in den Zelllysaten der Expositionsgruppe und der Kontrollgruppe. Diese sind hier gegenübergestellt. Mit dem Mann-Whitney-U-Test kann ein signifikanter Unterschied (p=0,026) zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. 24 h Exposition in normobarer Hyperoxie führt zu Degradation von IκBα. Die Western Blots waren reproduzierbar.

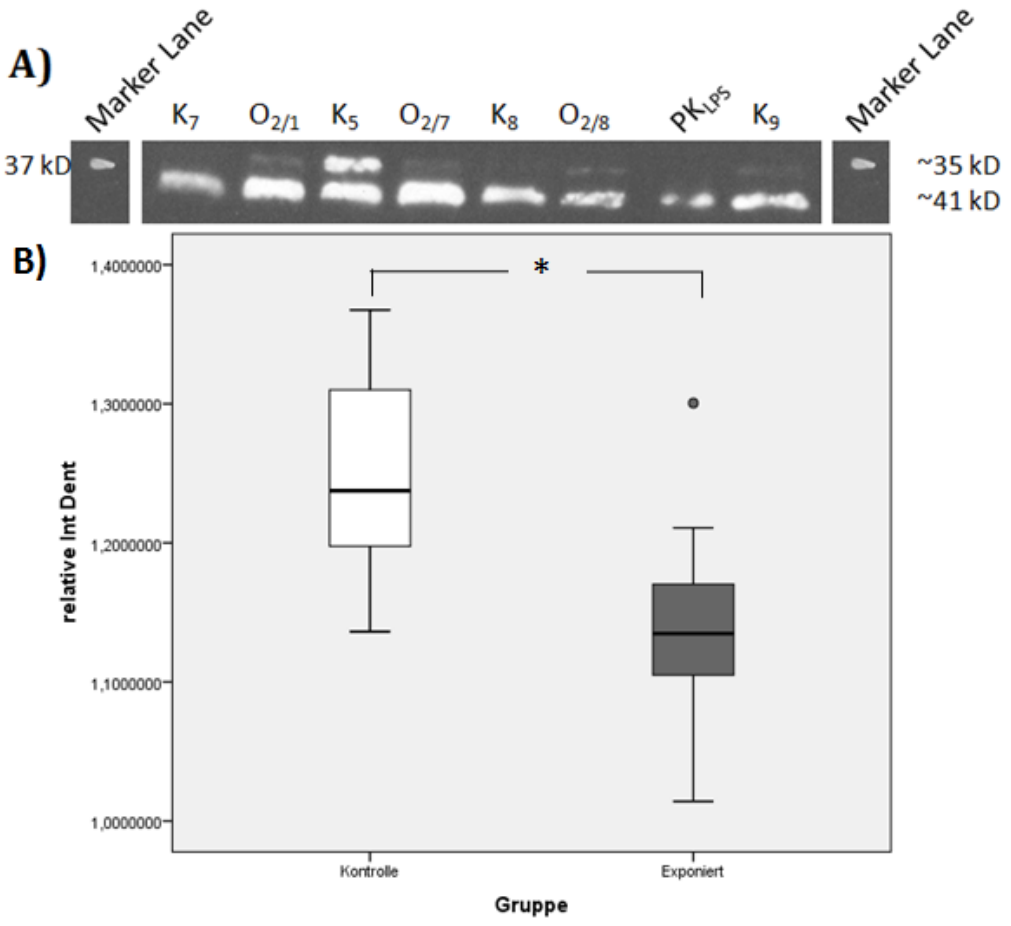

Abb. 15: **A)** Western Blot mit Antikörper gegen IκBα, K: Kontrolle, O2: Expositionsprobe, Zahlen im Index: Probennummer, PK: Positivkontrolle, LPS: Lipopolysaccharid **B)** Quantifizierung von IκBα nach 24h Sauerstoffexposition (n=9) und Normalatmosphäre als Kontrolle (n=6). Methode: Semiquantitativer Western Blot. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum, realtive Int Dent: Verhältnis Bandendichte/Dichte der internen Positivkontrolle, *: p=0,026, (Mann-Whitney U Test) ○: Ausreißer

3.2.1.2 Einfluss der Hyperoxie auf Nrf-2

Abbildung 16 zeigt die Quantifizierung von Nrf-2 in den Zelllysaten der Expositionsgruppe und der Kontrollgruppe. Diese sind hier gegenübergestellt. Mit dem Mann-Whitney-U-Test kann kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. 24 h Exposition in normobarer Hyperoxie führt zu keiner Erhöhung von Nrf-2. Bezogen wurden die Werte auf die Bezugskontrolle K_9 da keine Positivkontrolle zur Verfügung stand. Die Western Blots waren reproduzierbar.

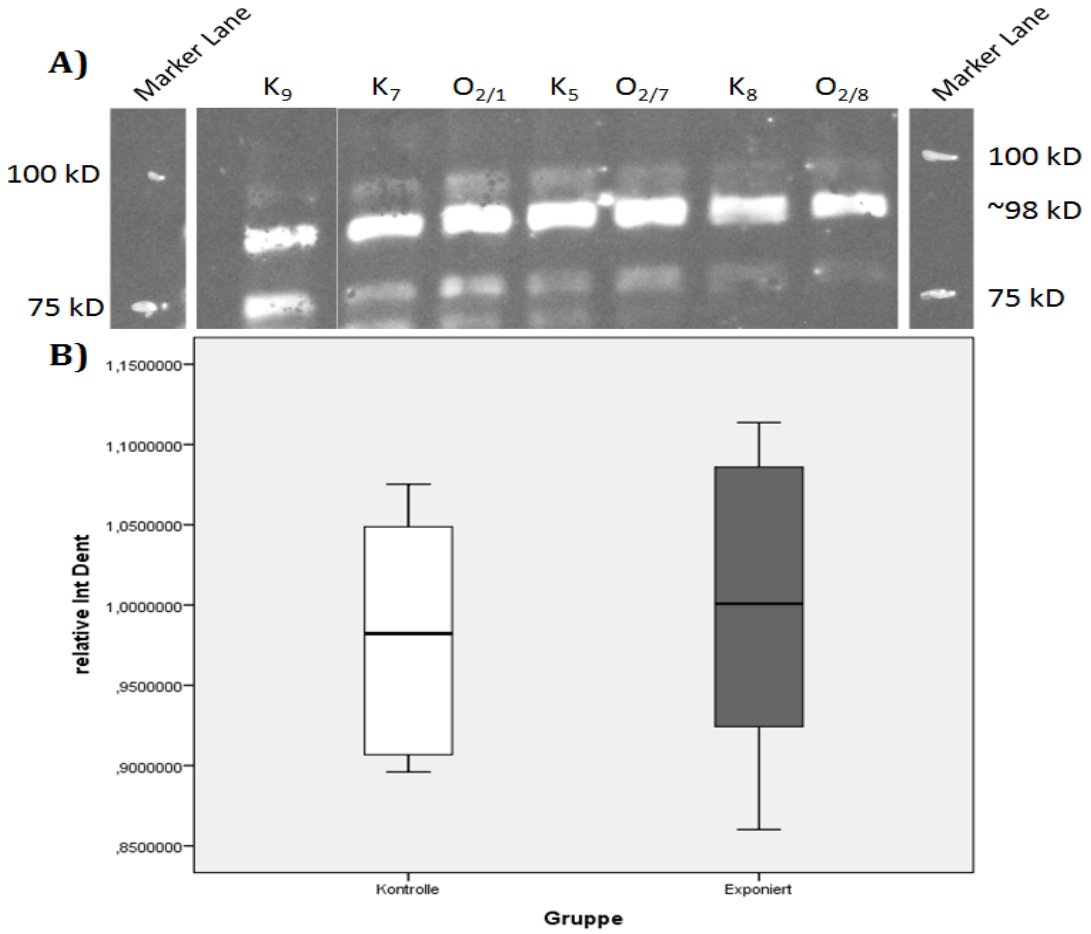

Abb. 16: **A)** Western Blot mit Antikörper gegen Nrf-2, K: Kontrolle, O2: Expositionsprobe, Zahlen im Index: Probennummer **B)** Quantifizierung von Nrf-2 nach 24h Sauerstoffexposition (n=6) und Normalatmosphäre als Kontrolle (n=6). Methode: Semiquantitativer Western Blot. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum, realtive Int Dent: Verhältnis Bandendichte/Dichte der internen Bezugskontrolle K_9

3.2.1.3 Einfluss der Hyperoxie auf HO-1

Abbildung 17 zeigt die Quantifizierung von HO-1 in den Zelllysaten der Expositionsgruppe und der Kontrollgruppe. Diese sind hier gegenübergestellt. Mit dem Mann-Whitney-U-Test kann kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. 24 h Exposition in normobarer Hyperoxie führt zu keiner Erhöhung von HO-1. Es sind alle drei Experimente einzeln dargestellt, da keine Positivkontrolle verwertbare Werte lieferte. Die Western Blots waren reproduzierbar.

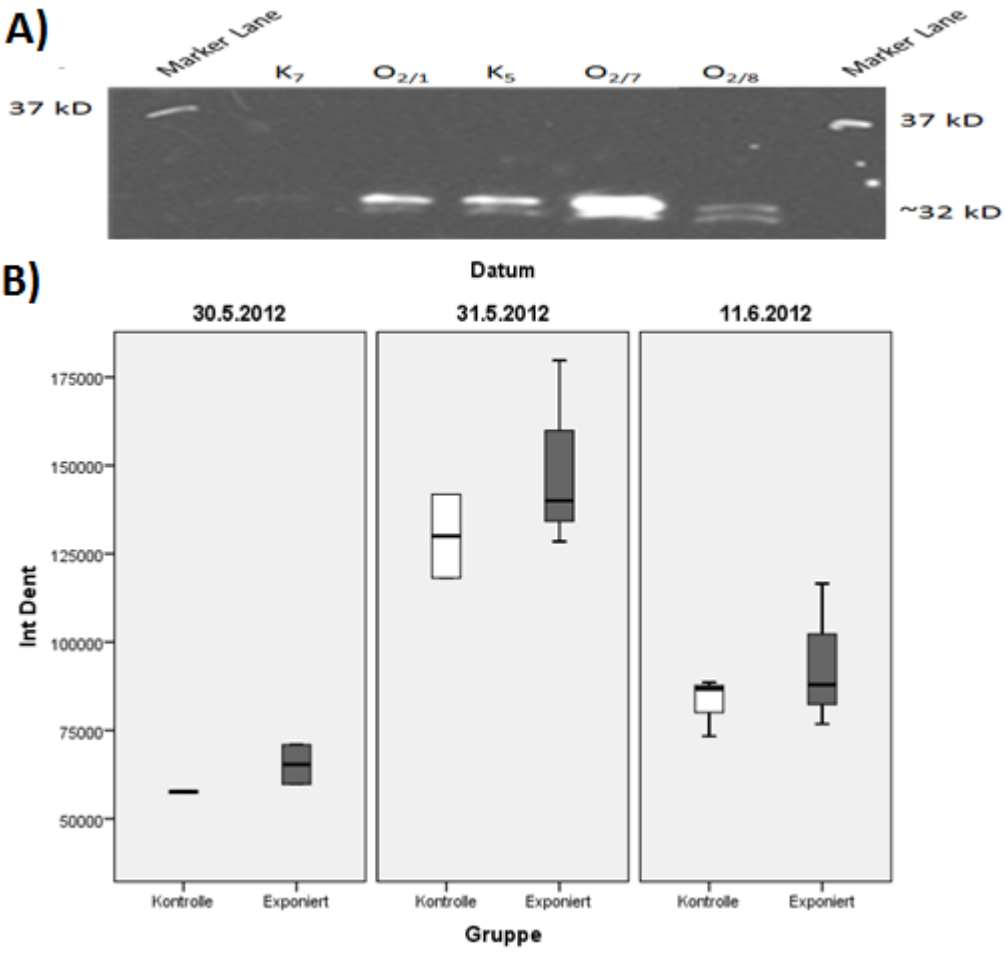

Abb. 17: **A)** Western Blot mit Antikörper gegen HO-1, K: Kontrolle, O2: Expositionsprobe, Zahlen im Index: Probennummer **B)** Quantifizierung der HO-1 nach 24h Sauerstoffexposition (n=9) und Normalatmosphäre als Kontrolle (n=6). Methode: Semiquantitativer Western Blot. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum. K: Kontrolle, O2: Expositionsprobe, Int Dent: Bandendichte

3.2.2 Einfluss der Hyperoxie Apoptosemarker

3.2.2.1 Einfluss der Hyperoxie auf Bax

Abbildung 18 zeigt die Quantifizierung von Bax in den Zelllysaten der Expositionsgruppe und der Kontrollgruppe. Diese sind hier gegenübergestellt. Mit dem Mann-Whitney-U-Test kann kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. 24 h Exposition in normobarer Hyperoxie führt zu keiner Erhöhung von Bax. Die Western Blots waren reproduzierbar.

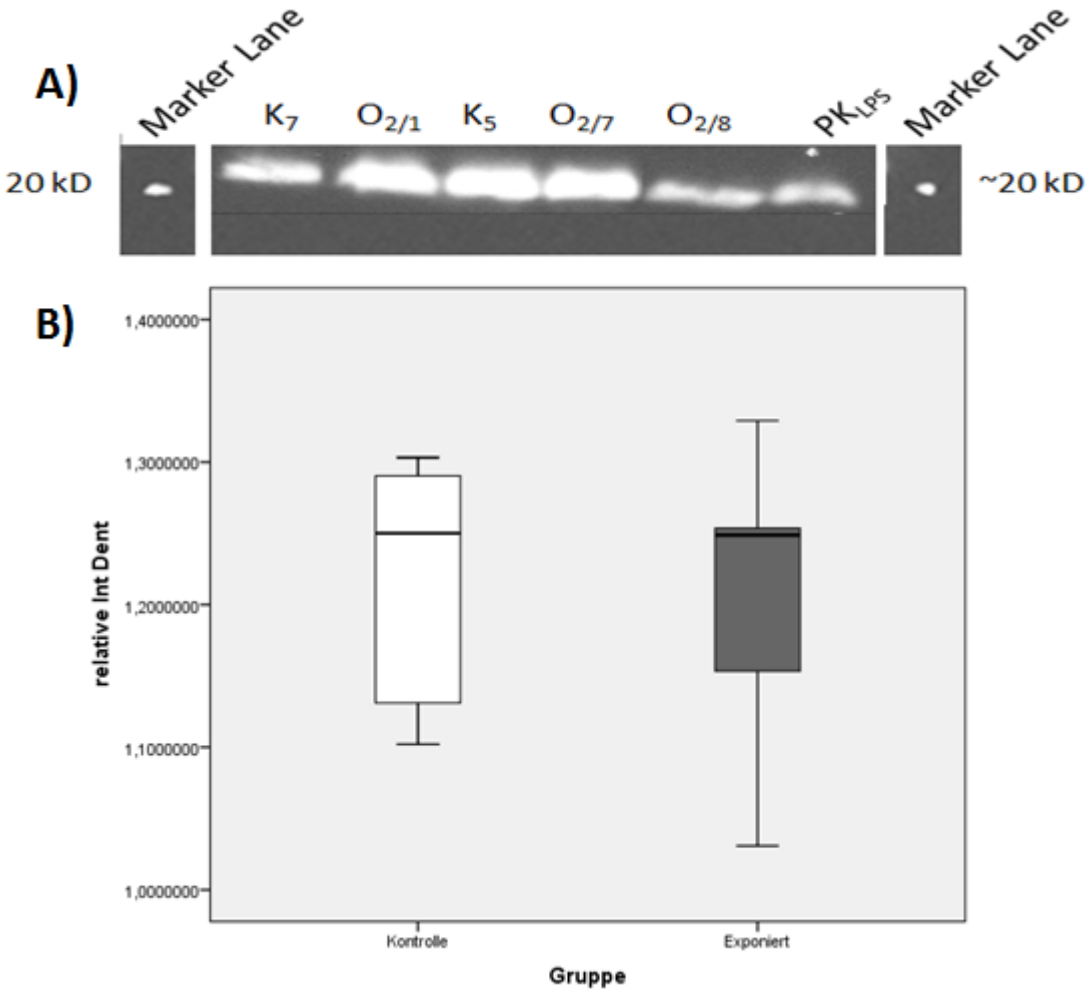

Abb. 18: **A)** Western Blot mit Antikörper gegen Bax, K: Kontrolle, O2: Expositionsprobe, Zahlen im Index: Probennummer, PK: Positivkontrolle, LPS: Lipopolysaccharid **B)** Quantifizierung von Bax nach 24h Sauerstoffexposition (n=9) und Normalatmosphäre als Kontrolle (n=6). Methode: Semiquantitativer Western Blot. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum, realtive Int Dent: Verhältnis Bandendichte/Dichte der internen Positivkontrolle

3.2.2.2 Einfluss der Hyperoxie auf Bcl-xL

Abbildung 19 zeigt die Quantifizierung von Bcl-xL in den Zelllysaten der Expositionsgruppe und der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Mit dem Mann-Whitney-U-Test kann ein signifikanter Unterschied (p=0,010) zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. 24 h Exposition in normobarer Hyperoxie führt zu vermehrter Menge an Bcl-xL. Die Western Blots waren reproduzierbar.

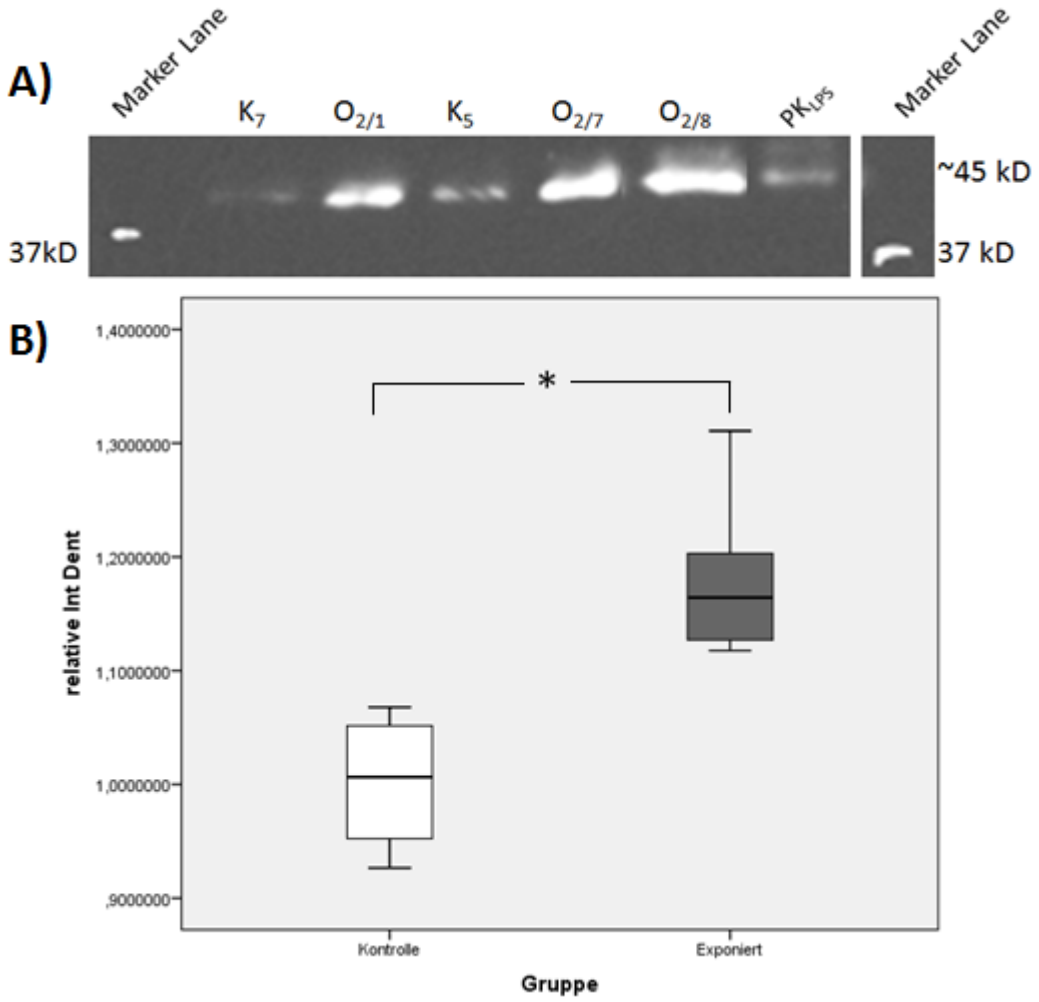

Abb. 19: **A)** Western Blot mit Antikörper gegen Bcl-xL, K: Kontrolle, O2: Expositionsprobe, Zahlen im Index: Probennummer, PK: Positivkontrolle, LPS: Lipopolysaccharid **B)** Quantifizierung von Bcl-xL nach 24h Sauerstoffexposition (n=6) und Normalatmosphäre als Kontrolle (n=4). Methode: Semiquantitativer Western Blot. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum, realtive Int Dent: Verhältnis Bandendichte/Dichte der internen Positivkontrolle, *: p=0,010, (Mann-Whitney U Test)

3.2.2.3 Verhältnis Bcl-xL und Bax

Abbildung 20 zeigt das Verhältnis von Bcl-xL und Bax in den Zelllysaten der Expositionsgruppe und der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Mit dem Mann-Whitney-U-Test kann ein signifikanter Unterschied (p=0,010) zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. 24 h Exposition in normobarer Hyperoxie führt einer Vergrößerung des Quotienten von Bcl-xL und Bax.

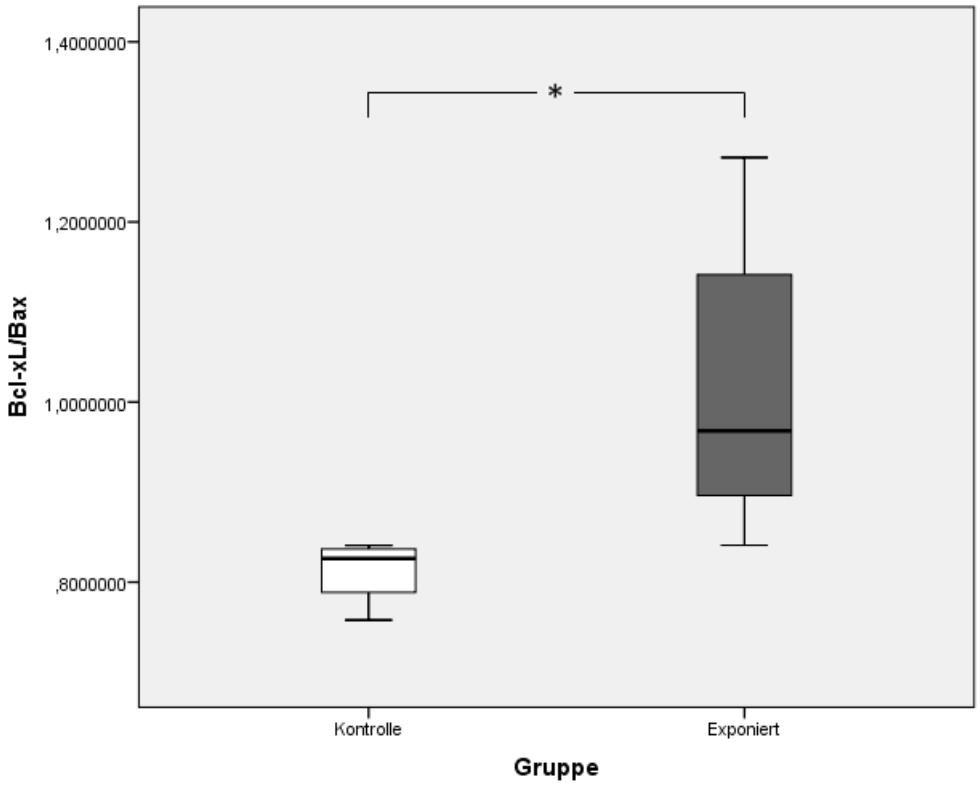

Abb. 20: Verhältnis Bcl-xL und Bax, Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum, Werte aus semiquantitativen Western Blots. *: p = 0,010, (Mann-Whitney U Test)

3.2.2.4 Einfluss der Hyperoxie auf die gespaltene Caspase 3

Abbildung 21 zeigt die Quantifizierung der gespaltenen Caspase 3 in den Zelllysaten der Expositionsgruppe und der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Mit dem Mann-Whitney-U-Test kann ein signifikanter Unterschied (p=0,019) zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. 24 h Exposition in normobarer Hyperoxie führt zu vermehrter Menge an gespaltener Caspase 3. Die Western Blots waren reproduzierbar.

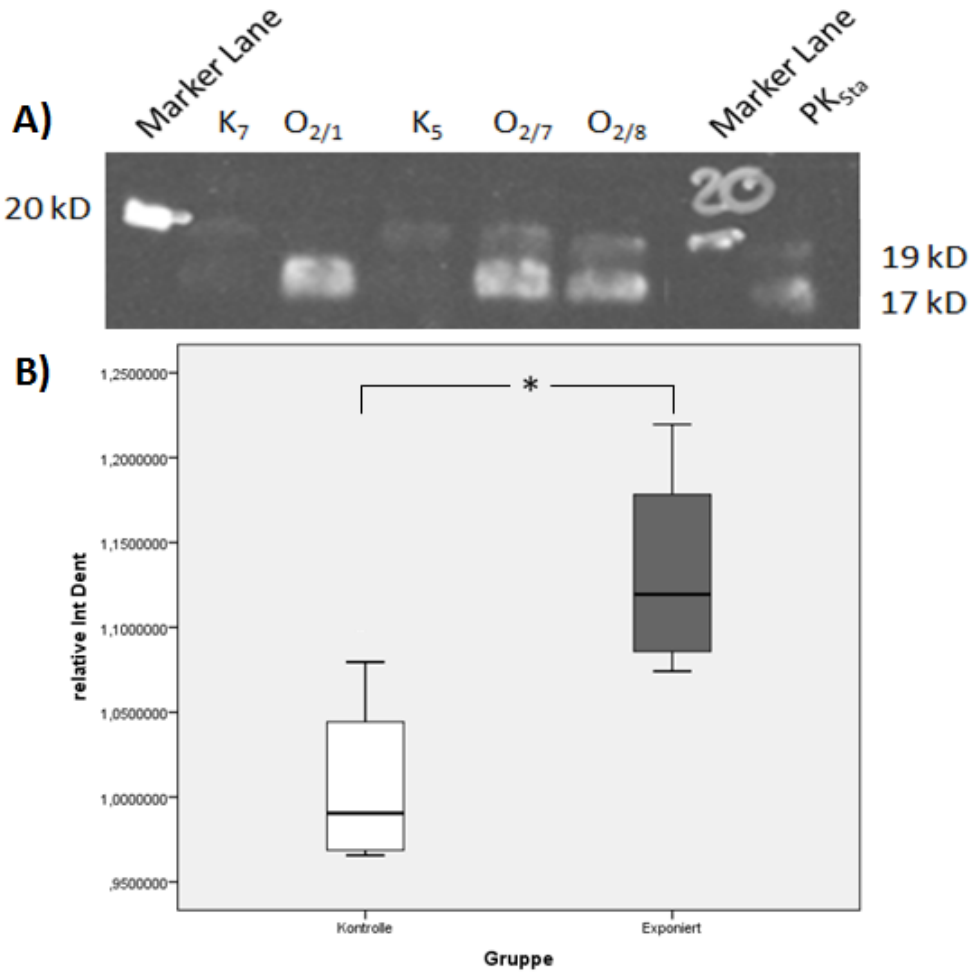

Abb. 21: **A)** Western Blot mit Antikörper gegen gespaltene Caspase 3, K: Kontrolle, O2: Expositionsprobe, Zahlen im Index: Probennummer, PK: Positivkontrolle Sta: Staurosporin **B)** Quantifizierung von gespaltener Caspase 3 nach 24h Sauerstoffexposition (n=6) und Normalatmosphäre als Kontrolle (n=4). Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum realtive Int Dent: Verhältnis Bandendichte/Dichte der internen Positivkontrolle, *: p=0,019, (Mann-Whitney U Test)

3.2.3 Einfluss der Hyperoxie die induzierbare NO-Synthase

Abbildung 22 zeigt die Quantifizierung von iNOS in den Zelllysaten der Expositionsgruppe und der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Da die Werte der Positivkontrolle für einen Bezugswert offensichtlich zu hoch waren, wurden alle Werte auf die Bezugskontrolle K_9 bezogen. Mit dem Mann-Whitney-U-Test kann ein signifikanter Unterschied (p=0,026) zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. 24 h Exposition in normobarer Hyperoxie führt zu verminderter Menge an iNOS. Die Western Blots waren reproduzierbar.

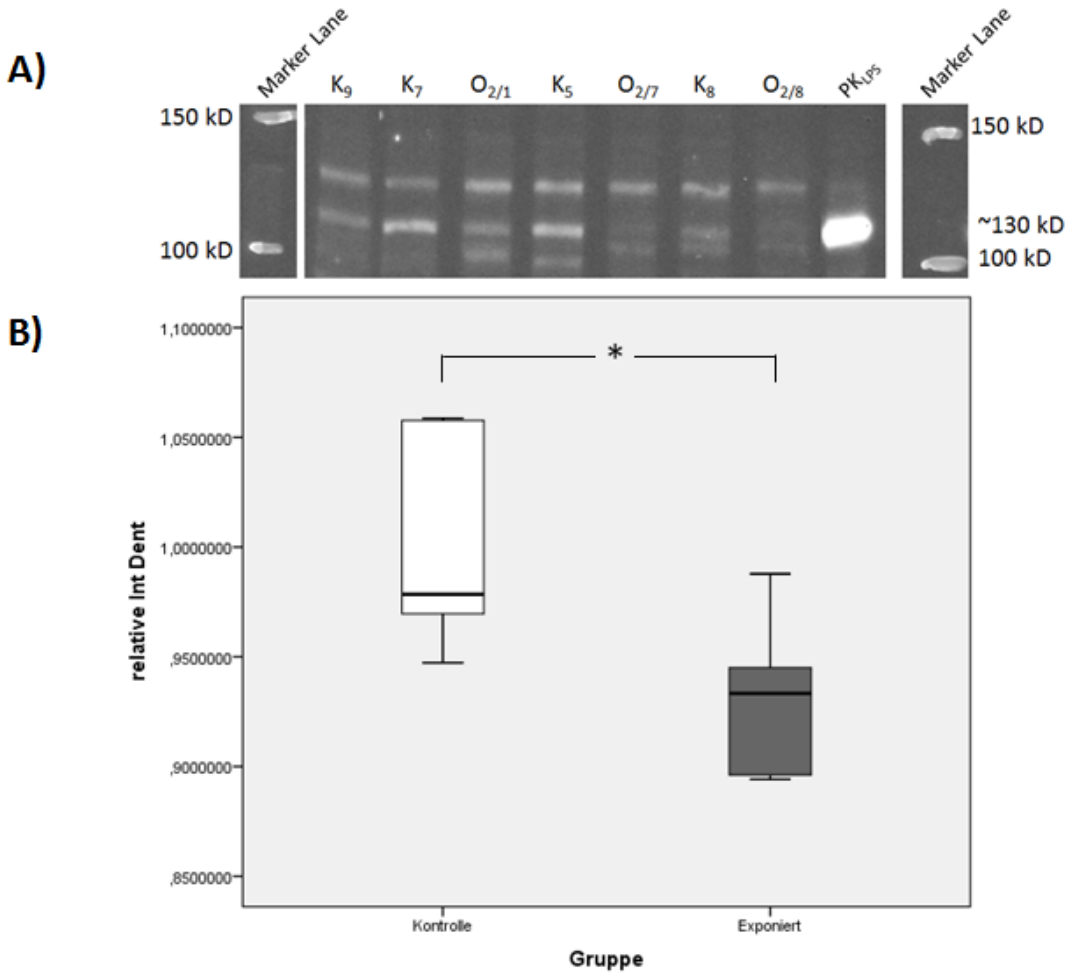

Abb. 22: **A)** Western Blot mit Antikörper gegen iNOS, K: Kontrolle, O2: Expositionsprobe, Zahlen im Index: Probennummer, PK: Positivkontrolle, LPS: Lipopolysaccharid **B)** Quantifizierung der iNOS nach 24h Sauerstoffexposition (n=6) und Normalatmosphäre als Kontrolle (n=6). Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum. K: Kontrolle, O2: Expositionsprobe, PK: Positivkontrolle, LPS: Lipopolysaccharid, Western Blot stellvertretend für zwei identische Wiederholungen, realtive Int Dent: Verhältnis Bandendichte/Dichte der internen Bezugskontrolle K_9, *: p=0,026, (Mann-Whitney U Test)

3.3 Immunzytochemie

Abbildung 23 zeigt die Immunzytologische Färbung gegen 3-Nitrotyrosin. Hier sind Normoxie und Hyperoxie behandelte Zellen gegenübergestellt. Mit dem Mann-Whitney-U-Test kann kein signifikanter Unterschied (p=0,59) zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. 24 h Exposition in normobarer Hyperoxie führt zu keinem Unterschied von 3-Nitrotyrosin in murinen Alveolarmakrophagen. Die Immunfärbungen waren reproduzierbar.

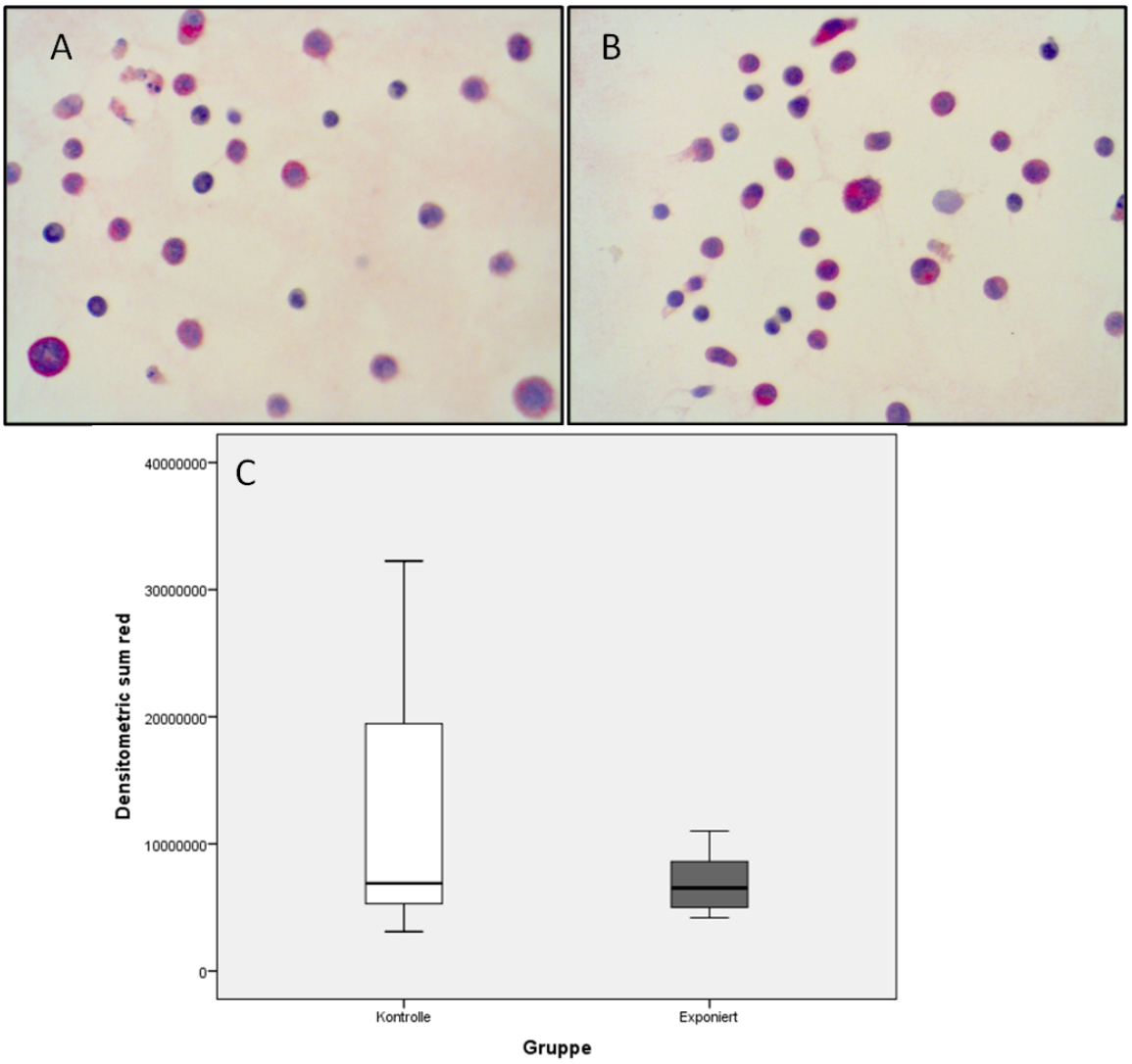

Abb. 23: **A)** 24 h Normoxie. Immunhistochemie gegen Nitrotyrosin, rot gefärbte Zellen enthalten Nitrotyrosin. **B)** 24h Hyperoxie, Färbung wie bei „A)". **C)** Darstellung der Densitometric sum red nach 24h Sauerstoffexposition (n=12) und Normalatmosphäre als Kontrolle (n=12). Untersuchung mit Hilfe des APAAP-Methode und Densitometrischer Messung. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum

3.4 Zusammenfassung

3.4.1 DNA-Schäden

Eine 24 stündige in vitro Exposition von Alveolarmakrophagen der Zellreihe AMJ2-C11 in normobarer Hyperoxie führt zu vermehrten DNA-Schäden.

Gleich behandelte Zellen der gleichen Zellreihe und Passage, welche nicht exponiert waren, zeigten signifikant ($p<0,001$) weniger DNA-Schäden auf, als die Expositionsgruppe.

3.4.2 Western Blots

Mit dem Verfahren des Western Blots konnte gezeigt werden, dass Bc-xL und gespaltene Caspase 3 signifikant erhöhte Werte aufzeigen. Bei IκBα und der iNOS wurden hingegen signifikant verminderte Werte registriert. Keinen Einfluss hingegen hat die die Hyperoxie auf Bax, HO-1 und Nrf-2.

Tabelle 6: Einfluss der normobaren Hyperoxie auf die untersuchten Proteine, Signifikanzmessung mit Mann-Whitney-Testverfahren

Erhöhte Proteinmenge	Erniedrigte Proteinmenge	Kein Unterschied an Proteinmenge
Caspase 3 (p=0,019)	IκBα (p=0,026)	Bax
Bcl-xL (p=0,010)	iNOS (p=0,026)	HO-1
		Nrf-2

3.4.3 Immunzytochemie

Eine 24 stündige in vitro Exposition von Alveolarmakrophagen der Zellreihe AMJ2-C11 in normobarer Hyperoxie führt zu keinem Unterschied von Nitrotyrosinmengen in den Zellen.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden und Ergebnisse

4.1.1 Ermittlung von DNA-Schäden mit Hilfe des Comet Assays

Die Methode an sich birgt die Gefahr, dass man bei der Auswahl der „Kometen“ schon tote - nekrotisierte und apoptische - Zellen misst. Diese fallen jedoch auf, da sie eine andere Morphologie unter dem Mikroskop besitzen. Ihr Zellkern grenzt sich hierbei nicht so gut von der Umgebung ab. Dies rührt daher, dass es im Verlauf von Apoptose und Nekrose zur Fragmentierung der DNA kommt [110]. Liegen Zellen bei der Auswertung zu nah beieinander, ist das Auswertefenster des Programms nicht richtig zu positionieren um das „Tailmoment“ einer Zelle zu messen. Ebenso können Artefakte - wie Staub - durch Ethidiumbromid angefärbt werden, welche die Messung verfälschen können. Aus diesem Grund wurden nur Zellen ausgewertet, welche sich gut vom Hintergrund abgrenzen ließen. Da die Entscheidung zu Auswahl auswertbarer Zellen eine stark subjektive ist, wurden alle Objektträger von nur einer einzigen Person ausgewertet. So konnten interindividuelle Abweichungen verhindert werden, wenngleich eine einzlene Person Ursache eines systematischen Fehlers sein kann.

4.1.2 Diskussion der DNA-Schäden

Zu Beginn der Arbeit sollte untersucht werden, ob die normobare Hyperoxie bei Alveolarmakrophagen zu vermehrten DNA-Schäden führt. In Abbildung 14 ist zu sehen, dass normobare Hyperoxie zu signifikant mehr DNA-Strangbrüchen führt, als bei der Kontrolle. Dass Zellen Schäden an der DNA davontragen, wenn sie Hyperoxie ausgesetzt werden, ist bekannt. [10, 52–54, 74]. Reparaturenzyme wie die Oxoguanin-Glycosylase und andere Reperaturenzyme führen zu Einzelstrangbrüchen oder durch Entfernung von Basen zu alkalilabilen Stellen [144]. Die Ausreißer und Extremwerte könnten möglicherweise durch Kontamination der Zellkultur während der Inkubation entstanden sein. Hierbei wäre möglich, dass durch Pathogene wie Bakterien oder Pilze, die Makrophagen aktiviert wurden. Durch diese Aktivierung

würden die Makrophagen als Phagozyten im Verlauf des „respiratory burst“ vermehrt ROS bilden, was zu DNA-Schäden führen kann [59]. Da jedoch sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Interventionsgruppe solche Werte zu finden sind, relativiert sich dies.

Da Zellen grundsätzlich in der Lage sind DNA-Läsionen zu reparieren, wurden sie direkt nach der Exposition schnellstmöglich fixiert und lysiert. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass manche Zellen wenige Minuten länger Zeit hatten, sich in Normalatmosphäre zu erholen. In diesem Studienmodell mit 24 stündiger Exposition dürfte dies jedoch vernachlässigbar sein. Um Auswirkungen der DNA-Schäden auf die Zellen zu untersuchen wurden weitere Experimente durchgeführt.

4.1.3 Diskussion der Proteine für zellulären Stress und Apoptosemarker

Um die Auswirkung der normobaren Hyperoxie auf zellulären Stress zu untersuchen, wurden Proteine des zellulären Stresses untersucht. Eine Auswirkung der normobaren Hyperoxie ist in Abbildung 15 zu sehen. So führt die 24 stündige Exposition von Alveolarmakrophagen zu signifikant weniger IκBα in den Zelllysaten. IκBα wird in der Zelle abgebaut, da es zuvor phosphoryliert wurde. Daraufhin wird es ubiquitiert und über das Proteasom abgebaut [79]. Somit wird NF-κB entlassen und kann als Transkriptionsfaktor in den Zellkern diffundieren. *Stilmann et al.* beschreiben, dass es möglich ist, dass IκBα phosphoryliert wird, indem die IKK durch DNA-Schäden aktiviert wird, wobei das Protein IKKγ – auch *NF-κB essential modifier (NEMO)* genannt - eine wichtige Rolle spielt [137]. Es konnte auch gezeigt werden, dass ROS, vor allem H_2O_2 selbst zur Bindung von NF-κB an DNA führt [93, 106, 141]. Ebenso zeigten Studien, dass NF-κB bei Hyperoxie ausgesetzten Zellen aktiviert ist [95, 127]. *Gozzelino et al.* beschreiben, dass durch erhöhte Konzentrationen von ROS in der Zelle vermehrt freie Häme vorkommen [57]. Ist die Hämkonzentration in Zellen erhöht, führt dies ebenso zu einer Translokation von NF-κB in den Zellkern [4]. NF-κB spielt zwar auch bei der Immunantwort eine wichtige Rolle, jedoch wurde darauf geachtet, dass die Zellkulturen nicht kontaminiert wurden. Möglicherweise ist

bei den hier erzielten Ergebnissen einer dieser Mechanismen (vgl. **Abb. 11**) dafür verantwortlich, dass IκBα in dieser Studie durch Hyperoxie vermindert ist.

In dieser Arbeit konnte jedoch keine veränderte Expression von Nrf-2 aufgezeigt werden (vgl. **Abb. 16**). Es wurde allerdings in Studien beobachtet, dass Nrf-2 bei Hyperoxie vermehrt nachgewiesen werden konnte [113, 122]. Eventuell besteht die Möglichkeit, dass NF-κB Nrf-2 während zellulären Stresses unterdrückt [94]. Hierbei konkurriert NF-κB mit Nrf-2 um den Co-Aktivator *CREB-binding-Protein (CBP)* [99]. Nrf-2 wird von aktivierten Caspasen gespalten und inaktiviert [42]. Bei schon begonnener Apoptose, wäre eine Adaption dann nicht mehr möglich. Möglicherweise erklärt einer dieser Mechanismen die Ergebnisse.
Hyperoxie gilt über Nrf-2 als starker Aktivator der HO-1 [124]. Oben genannte freie Häme kommen nicht nur bei erhöhten ROS-Konzentrationen in der Zelle vor, sie sind selbst in der Lage ROS zu bilden, welche zu Expression von HO-1 führen sollen [57]. *Rothfuß et al.* konnten nachweisen, dass nach hyperbarer Sauerstoffexposition vermehrt HO-1 in humanen Lymphozyten zu finden ist. Ebenso berichten andere über die vermehrte Expression von HO-1 in diversen Hyperoxiemodellen [38, 41, 76, 102, 119]. Auch konnten *Seixas et al.* zeigen, dass die Expression von HO-1 die pro-oxidativen Eigenschaften von freien Hämen entschärft, und somit vor Apoptose schützt [126]. Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen jedoch – zwar bei erkennbarem Trend - keinen signifikanten Unterschied zwischen exponierten Zellen und der Kontrolle. *Phyllis et al.* bemerkten, dass in Lungengewebe von Exponierten- und Kontrollratten der signifikante Unterschied nach drei Tagen verschwindet. Es besteht wahrscheinlich eine zeitliche negative Tendenz, was die Expression von HO-1 angeht [34]. Die Halbwertszeit der HO-1 liegt bei circa 15 Stunden [135]. Es konnte in diversen Gewebetypen gezeigt werden, dass das Maximum an HO-1 1 Stunde nach Reiz erreicht wird. Nach 6 Stunden erreichen die Proteinlevel wiederum Ausgangsniveau [103]. Möglicherweise reagieren Alveolarmakrophagen nur in den ersten Stunden auf oxidativen Stress, indem sie Nrf-2 und HO-1 herauf regulieren und sind in Folge der massiven oxidativen Schäden und möglichem Eintritt in die Apoptose später nicht mehr fähig Nrf-2 und HO-1 zu exprimieren.

Bei der daraufhin folgenden Untersuchung der Apoptosemarker konnte gezeigt werden, dass die mit Sauerstoff behandelten Alveolarmakrophagen vermehrt Bcl-xL exprimieren, jedoch kein Unterschied bei der Expression von Bax besteht (vgl. **Abb. 18, 19, 20**).

Gleiche Ergebnisse wie in dieser Studie erzielten *O'Reilly et al* Lungen von Mäusen. [111]. Das Verhältnis von Bcl-xL und Bax verschiebt sich dementsprechend Richtung Bcl-xL.

Die vermehrte Expression von Bcl-xL durch NF-κB stellt einen Weg dar, Apoptose zu verhindern. *Khoshnan et al*. zeigten diese Kaskade in Lymphozyten auf [83] und *Glasgow et al.* in Gehirngewebe [56]. *Franek et al.* zeigten, dass ein höheres basales Level an NF-κB Zellen vor dem Tod schützen kann. [43] Bei zellulärem Stress ist NF-κB also in der Lage Apoptose zu verhindern, es kann allerdings auch zu Apoptose führen [43, 75, 146]. So zeigten *Kaltschmidt et al.* die pro-apoptotische Rolle von NF-κB-Aktivierung durch H_2O_2 auf [77].

Cytochrom c kann - nachdem es durch Bax aus der Mitochondrienmembran entlassen wurde - als Hämprotein zur Freisetzung von ROS führen [57]. Die eventuelle Aktivierung der *p38 Mitogen-aktivated-Protein-Kinase (MAPK)* durch ROS wird diskutiert [4, 57]. Über den Weg der *Phopspatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt* könnte vermehrt Bcl-xL exprimiert werden (vgl. **Abb. 11**).

Zellen sind zudem bei oxidativem Stress über die Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in der Lage direkt Bax zu phosphorylieren und somit zu deaktivieren [49]. Man kann vermuten, dass Alveolarmakrophagen diesen Weg nutzen um Bax zu kontrollieren, während sie im gleichen Moment versuchen Bcl-xL heraufzuregulieren. Möglicherweise stellt dies einen Versuch dar, dem intrinsischen Weg der Apoptose zu entkommen. *Budinger et al.* bewiesen, dass die vermehrte Expression von Bcl-xL Fibroblasten davor schützen kann, während Hyperoxie zu sterben [18].

Die Expression von Bcl-2 Proteinen muss in der Zelle streng kontrolliert werden. In gesunden Zellen sind diese dafür da, gesunde Zellen am Leben zu halten, während geschädigte Zellen in die Apoptose geführt werden sollen. Es ist durchaus möglich,

dass die exponierten Zellen in Folge massiver oxidativer Schäden nicht mehr in der Lage sind dieses Gleichgewicht zu halten. Indem extrem vermehrt Bcl-xL exprimiert wird, versucht die Zelle sich so vor dem Zelltod zu schützen.

In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass es bei den exponierten Alveolarmakrophagen zu einer signifikanten Steigerung an gespaltener – und somit aktivierter - Caspase 3 kommt (vgl. **Abb. 21**). Es scheint also, dass trotz der enormen Anstrengung der Zelle Bcl-xL bereitzustellen, die Caspasekaskade doch ausgelöst wird. *Romashko et al.* und *Barazonne et al.* war es nicht möglich in Lungenepithel von Mäusen erhöhte Caspase 3 Werte aufzuzeigen [8, 123]. Allerdings konnten *Zhang et al.* in Lungenepithel und *Budinger et al.* in Fibroblasten nachweisen, dass durch Hyperoxie die Caspase 9 aktiviert wird [18, 148].

Eine denkbare Aktivierung von Caspasen in dieser Studie durch den Fas-Rezeptor erscheint unwahrscheinlich, da nachgewiesen werden konnte, dass bei Fas-Knockout und mit TNF-α blockierten Mäusen keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Sauerstofftoxizität nachzuweisen war [112]. *Dumont et al.* zeigten, dass bei Behandlung von Zellen mit H_2O_2 diese in Apoptose eintreten. Dabei bemerkten sie, dass der Fas-Rezeptor irrelavant, jedoch die Aktivierung von NF-κB wichtig ist [35]. Hierbei führte H_2O_2 – als Mitglied der ROS - zu einer Aktivierung der Caspase 3.

Die Daten dieser Studie sprechen dafür, dass ROS – ob mitochondrialen oder zytosolischen Ursprungs – selbst und auch DNA-Schäden durch ROS zur Spaltung von Caspase 3 und dadurch eindeutig zu Apoptose der Alveolarmakrophagen führt. Dass sich dennoch das Verhältnis von Bcl-xL und Bax zugunsten von Bcl-xL verschiebt, kann hierbei als Adaptation der Zelle an die Exposition gedeutet werden.

4.1.4 Nitrosativer Stress

In dieser Studie sollte herausgefunden werden, ob Alveolarmakrophagen bei normobarer Hyperoxie an nitrosativem Stress leiden. Die Bildung von 3-Nitrotyrosin würde für erhöhte Konzentrationen an Peroxinitrit sprechen, welches zu DNA-Schäden führen kann [1].

So konnten auch *Lamb et al.* bei einer Studie an beatmeten Patienten mit Akutem Lungenversagen (ARDS) eine erhöhte Menge an 3-Nitrotyrosin feststellen [90]. Ebenso zeigten *Lorch et al.* auf, wie Hyperoxie in Mäuselungen zu erhöhten Konzentrationen von 3-Nitrotyrosin führen [100] können und *Narasaraju et al.* berichteten ebenfalls von vermehrter Nitrotyrosinbildung nach Hyperoxie. Sie postulierten hierbei, dass die *Myeloperoxidase* aktivierter Makrophagen eine Rolle spielen könnte [108].

Eine wichtige Quelle von Stickstoffmonoxid in der Lunge sind die Alveolarmakrophagen. Zytotoxische Effekte aktivierter Alveolarmakrophagen auf Lungenepithel wurden von *Hirano* beobachtet [69]. So ist die Bildung von Peroxinitrit bei aktivierten Makrophagen für die Inhibition der mitochondrialen Atmung verantwortlich [139]. Andererseits wird über die protektive Wirkung von NO diskutiert [48, 136]. Es existiert für die iNOS eine Promotorenstelle, an welche *NF-κB* bindet und es somit reguliert [118](vgl. **Abb. 11**). *Pepperl et al.* konnte zeigen, dass iNOS durch Hyperoxie über diesen Weg hochreguliert wird.

Ob gerade Hyperoxie bei Makrophagen auch zu einer vermehrten Expression von iNOS führt, wurde während dieser Arbeit untersucht. Umso überraschender waren die Ergebnisse des Western Blot mit Antikörpern gegen iNOS (vgl. **Abb. 22**). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Kontrollen bei 21 Prozent Luftsauerstoff signifikant mehr iNOS zeigen, als die Alveolarmakrophagen in Exposition. Dies widerspricht den Ergebnissen von *Liao et al.*, welche zeigen konnten, dass erhöhte Sauerstoffpartialdrücke zu einer vermehrten Transkription und Translation der iNOS führt [96]. *Liao et al.* untersuchten allerdings den Effekt der Hyperoxie auf Epithelzellen. *Pepperl et al*. beobachteten hingegen bei Alveolarmakrophagen keinen Unterschied zwischen Hyperoxie (95% O_2) und Kontrolle. Wie auch HO-1 und Nrf-2

scheint iNOS in einem zeitlichen Ablauf unterschiedlich exprimiert. So zeigten *Conelly et al.*, dass bei Stimmulation (mit LPS) Makrophagen nach 12 Stunden aufhören, die iNOS maximal zu exprimieren.

Auch die hier erzielten Ergebnisse sprechen dafür, dass 24 Stunden Exposition zu einer Regulierung führt, die in einer verminderten Menge an iNOS resultiert. Dies lässt einen Feedbackmechanismus vermuten, der verhindern soll, dass noch mehr nitrosativer Stress aufgrund der NO-Produktion entsteht [24, 84]. In murinen Makrophagen wurde von *Ratovitski et al.* das Protein NAP110 beschrieben, welches direkt die iNOS hemmt und diese so vor toxischen Mengen von NO schützen soll [121]. Ebenso existiert eine Autoregulation der iNOS, indem Stickstoffmonoxid selbst in die Transkription eingreift [84].

Da die Alveolarmakrophagen, welche - wie in Abbildung 23 gezeigt – keinen Unterschied bezüglich 3-Nitrotyrosin aufweisen, lässt sich schlussfolgern, dass iNOS - wie auch im WesternBlot gezeigt – nach 24 Stunden Exposition nicht vermehrt vorhanden und aktiv ist.

4.1.5 Diskussion der Fehlermöglichkeiten beim Western Blot

Um den Abbau der Proteine durch Proteasen zu verhindern, wurden Proteaseinhibitoren in das Lysat gegeben. Da dies mit der Bradfordreagenz interagiert, ist hier ein systematischer Fehler aufgetreten. Dies relativiert sich, insofern es sowohl Expositionsproben als auch Kontrollen gleichermaßen betrifft. Bei dem Nachweis von

HO-1 war keine Positivkontrolle zur Verfügung. Aus diesem Grund war eine Relativierung der Proben nicht möglich.

Grundsätzlich ist es möglich, dass durch das manuelle Laden der Gele, unterschiedliche Proteinmengen aufgetragen wurden. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass beim Blotten Luftblasen die Bandenintensität mindern können oder beim Entwickeln, Banden verrutschen. Durch mehrmalige Wiederholungen der Experimente wurden diese Fehler statistisch minimiert.

4.2 Schlussfolgerung

4.2.1 Interpretation

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass die Exposition von Alveolarmakrophagen (AMJ2-C11) in normobarer Hyperoxie zu signifikant mehr DNA-Schäden führt, als bei Normoxie. Vermutlich ist dies durch oxidativen Stress bedingt. In Folge dessen kommt es zur Degradation von IκBα und somit zu einer wahrscheinlichen Aktivierung von NF-κB. Dies führt zu einer signifikanten Verschiebung des Verhältnisses von Bcl-xL und Bax. Obwohl NF-κB aktiviert wird, ist keine Steigerung der Expression von HO-1 und Nrf-2 zu sehen. Erstaunlich ist die Tatsache, dass die inudizierbare NO-Synthase in diesem Studienmodell bei Hyperoxie weniger exprimiert wird, als bei der Kontrolle, woraufhin sich sich kein erhöhtes 3-Nitrotyrosin im Immunzytochemieverfahren nachweisen lässt. Allerdings kommt es trotz der verstärkten Expression von Bcl-xL als Adaptationsreaktion zu einer Aktivierung der Caspase 3, was für ablaufende Apoptose von Alveolarmakrophagen bei normobarer Hyperoxie spricht.

4.2.2 Ausblick

Um weiteres Verständnis für den Einfluss von Hyperoxie auf Alveolarmakrophagen zu erhalten, wäre die Untersuchung weiterer Proteine interessant. So bieten sich die Proteinkinase C (PKC) und die IκBα-Kinase (IKK) an, um den Mechanismus der IκBα-Degradation in Folge der DNA-Schäden zu untersuchen und die (fehlende) Nrf-2 und HO-1 Aktivierung bei Hyperoxie zu klären. Definitiv sollte ein Blot gegen HO-1 mit funktionierender Postivkontrolle oder einer Bezugskontrolle durchgeführt werden.

Die Auswirkungen von p53 bei hyperoxischen DNA-Schäden sollte analysiert werden, hinsichtlich der Wirkung dessen auf die Mitochondrien. Um auch die verstärke Expression von Bcl-xL zu untersuchen, wäre die Analyse des p38/MAPK-PI3K-Wegs eine denkbare Möglichkeit. Zur Aufklärung, warum Caspase 3 gespalten wird, muss bewiesen werden, ob der intrinsische Weg – über Apaf-1 und Caspase 9 - oder eine andere Aktivierung hierfür verantwortlich ist. Die Auswirkungen der aktivierten Caspase 3 auf Proteine die von dieser gespalten werden, wären beispielsweise mit

dem Nachweis von ICAD / CAD zu erbringen (vgl. **Tabelle 2**). Untersuchungen von Zytokinen, wie IL-6, IL-11 oder TNFα könnten [145] zu einem besseren Verständnis von Kommunikation der Zellen bei Hyperoxie untereinander beitragen.

Um die Apoptose in Folge von DNA-Schäden während normobarer Hyperoxie nachzuweisen, könnte die Annexin-V – Markierung durchgeführt werden, da hier zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen unterschieden werden kann.

Der Comet Assay ist ein sehr sensitiver Test für DNA-Schäden. Jedoch ist er nicht spezifisch, was die Ursache für die Schäden angeht [39]. Hierfür würden sich die HPLC-Electrospray-Tandem-Massenspektrometrie-Methode oder der elektro-chemische Nachweis der DNA-Oxiadation anbieten, da sich durch diese Guaninoxidation oder Thymindimere durch oxidative Schäden nachweisen lassen [89].

Ebenso würde es sich anbieten, das Studienmodell so zu ändern, dass verschiedene Sauerstoffkonzentrationen auf Alveolarmakrophagen wirken können. 95%-Sauerstoffatmosphäre erscheint als sehr toxisch für die Zellen. Hierbei würden sich 10% Schritte (z.B. 30%, 40%, 50% etc.) anbieten. Auch wäre es gut, die Expositionen verschieden lang zu machen (z.B. 2h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h). So wäre es möglich, die toxische Grenze für diese Zellart zu ermitteln und ihre Anpassung bei den einzelnen Konzentrationen und Zeitpunkten zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Sauerstofftherapie ist in der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken. So ist die künstliche Beatmung mit Hyperoxie elementar wichtig und wird unter anderem dazu genutzt, Patienten mit insuffizienter Atmung zu behandeln.

Jedoch ist bekannt, dass länger anhaltende Exposition mit erhöhten Sauerstoffpartialdrücken zu einer übermäßigen Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen kann. ROS führen zu Schäden an der DNA, beeinflussen direkt und indirekt Signalmoleküle, Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren, sowie pro- und anti-apoptotische Proteine. Da Alveolarmakrophagen aufgrund ihrer physiologischen Position in der Lunge direkt dem alveolären Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt sind, wurde in dieser Studie untersucht, wie sich die 24 stündige Exposition bei normobarer Hyperoxie (95% Sauerstoff, 5% CO_2-Gasgemisch) auf den zellulären Stress auswirkt.

Primäre DNA-Schäden wurden mittels des Comet-Assays identifiziert. Hierbei konnte ein signifikanter ($p<0,001$) Anstieg von DNA-Schäden von Expositionsgruppe gegenüber standardinkubierten (21% Sauerstoff-5% CO_2) Kontrollen nachgewiesen werden.

Veränderungen in der Genexpression wurden über die Methode des Western Blots detektiert. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen IκBα, Nrf-2 und HO-1, um die Adaptation an die Hyperoxie zu untersuchen. Dabei konnte lediglich für IκBα ein signifikanter ($p<0,05$) Abfall gezeigt werden, was für eine Aktivierung von NF-κB spricht.

Caspase 3, Bax und Bcl-xL wurden als Apoptosemarker überprüft. Hierbei fiel eine signifikant erhöhte ($p<0,05$) aktivierte Caspase 3 bei der Expositionsgruppe auf, während auch Bcl-xL in dieser signifikant ($p<0,05$) anstieg, Bax jedoch nicht.

Des Weiteren wurde der nitrosative Stress untersucht. Hier diente die inudizierbare NO-Synthase (iNOS) als Marker im Western Blot und Nitrotyrosin als Marker in der Immunzytochemie.

Die iNOS wurde bei Hyperoxie weniger exprimiert ($p<0,05$) als bei der Kontrolle, woraufhin sich kein erhöhtes 3-Nitrotyrosin im Immunzytochemieverfahren nachweisen lässt.

Die DNA-Schäden sind vermutlich durch oxidativen Stress bedingt. In Folge dessen kommt es zur Degradation von IκBα und einer wahrscheinlichen Aktivierung von NF-κB. Dies verschiebt das Verhältnisses von Bcl-xL und Bax signifikant ($p<0,05$), was als Adaptation der Zelle an die Hyperoxie interpretiert werden kann. HO-1 und Nrf-2 werden dagegen nicht beeinflusst. Ungeachtet des erhöhten Verhältnisses von Bcl-xL/Bax wird Caspase 3 aktiviert. Dies spricht für ablaufende Apoptose von Alveolarmakrophagen bei normobarer Hyperoxie.

6. Literaturverzeichnis

[1] Abu-Qare AW and Abou-Donia MB: Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*. 4, 313–332 (2001).

[2] Ahmed MN, Codipilly C, Hogg N and Auten RL: The protective effect of overexpression of extracellular superoxide dismutase on nitric oxide bioavailability in the lung after exposure to hyperoxia stress. *Experimental Lung Research*. 37, 10–17 (2011).

[3] Arneson RM: Substrate-induced chemiluminescence of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 136, 352–360 (1970).

[4] Arruda MA, Rossi AG, Freitas MS de, Barja-Fidalgo C and Graça-Souza A V.: Heme Inhibits Human Neutrophil Apoptosis: Involvement of Phosphoinositide 3-Kinase, MAPK, and NF-κB. *The Journal of Immunology*. 173, 2023–2030 (2004).

[5] Babior BM: The respiratory burst of phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 73, 599–601 (1984).

[6] Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL and Korsmeyer SJ: Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*. 41, 899–906 (1985).

[7] Baldridge CW and Gerard RW: The Extra Respiration of Phagocytosis. *American Journal of Physiology -- Legacy Content*. 103, 235–236 (1932).

[8] Barazzone C, Horowitz S, Donati YR, Rodriguez I and Piguet PF: Oxygen toxicity in mouse lung: pathways to cell death. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 19, 573–581 (1998).

[9] Barker S, Weinfeld M and Murray D: DNA–protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 589, 111–135 (2005).

[10] Barnes DE: DNA damage: air-breaks? *Current Biology: CB*. 12, 262–264 (2002).

[11] Barth E, Bassi G, Maybauer DM, Simon F, Gröger M, Oter S, Speit G, Nguyen CD, Hasel C, Möller P, Wachter U, Vogt JA, Matejovic M, Radermacher P and Calzia E: Effects of ventilation with 100% oxygen during early hyperdynamic porcine fecal peritonitis. *Critical care medicine*. 36, 495–503 (2008).

[12] Beckman JS: Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chemical research in toxicology*. 9, 836–844 (1996).

[13] Berg JT, White JE and Tsan MF: Response of alveolar macrophage-depleted rats to hyperoxia. *Experimental lung research*. 21, 175–185 (1995).

[14] Bernt JJ: *Vorlesungen über die Rettungsmittel beym Scheintode und in plötzlichen Lebensgefahren*. C. Gerold (1819).

[15] Bingisser RM and Holt PG: Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. *Swiss medical weekly*. 131, 171–179 (2001).

[16] Blanchet M-R, Israël-Assayag E and Cormier Y: Inhibitory effect of nicotine on experimental hypersensitivity pneumonitis in vivo and in vitro. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 169, 903–909 (2004).

[17] Brady HJM and Gil-go G: Molecules in focus Bax . The pro-apoptotic Bcl-2 family member , Bax. *The international journal of biochemistry & Cell Biology*. 30, 647–650 (1998).

[18] Budinger GRS, Tso M, McClintock DS, Dean DA, Sznajder JI and Chandel NS: Hyperoxia-induced apoptosis does not require mitochondrial reactive oxygen species and is regulated by Bcl-2 proteins. *The Journal of biological chemistry*. 277, 15654–15660 (2002).

[19] Burcham PC: Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis*. 13, 287–305 (1998).

[20] Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS and Tannenbaum SR: The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutation research*. 424, 37–49 (1999).

[21] Carnesecchi S, Deffert C, Pagano A, Garrido-Urbani S, Métrailler-Ruchonnet I, Schäppi M, Donati Y, Matthay MA, Krause K-H and Barazzone Argiroffo C: NADPH oxidase-1 plays a crucial role in hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 180, 972–981 (2009).

[22] Ceriello A: Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress. *International Journal of Clinical Practice. Supplement*. 129, 51–58 (2002).

[23] Chance B, Sies H and Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*. 59, 527–605 (1979).

[24] Chang K, Lee S-J, Cheong I, Billiar TR, Chung H-T, Han J-A, Kwon Y-G, Ha K-S and Kim Y-M: Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of IkappaB. *Experimental & molecular medicine*. 36, 311–324 (2004).

[25] Chao DT and Korsmeyer SJ: Bcl-2 Family: Regulators of Cell Death. *Annual Review of Immunology*. 16, 395–419 (1998).

[26] Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M and Lunec J: Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*. 17, 1195–1214 (2003).

[27] Cooke MS, Olinski R and Evans MD: Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 365, 30–49 (2006).

[28] Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H and Mason DY: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*. 32, 219–229 (1984).

[29] Danial NN and Korsmeyer SJ: Cell Death: Critical Control Points. *Cell*. 116, 205–219 (2004).

[30] Deakin CD, Nolan JP, Soar J, Sunde K, Koster RW, Smith GB and Perkins GD: Erweiterte Reanimationsmaßnahmen für Erwachsene („advanced life support“). *Notfall + Rettungsmedizin*. 13, 559–620 (2010).

[31] Dean RT, Fu S and Stocker: Biochemistry an pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal*. 324, 1–18 (1997).

[32] Dedon PC and Tannenbaum SR: Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 423, 12–22 (2004).

[33] Deneke SM and Fanburg BL: Normobaric oxygen toxicity of the lung. *The New England Journal of Medicine*. 303, 76–86 (1980).

[34] Dennery PA, Rodgers PA, Lum MA, Jennings BC and Shokoohi V: Hyperoxic Regulation of Lung Heme Oxygenase in Neonatal Rats. *Pediatric Research*. 40, 815–821 (1996).

[35] Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Dröge W and Schmitz ML: Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene*. 18, 747–757 (1999).

[36] Duncan MW: A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids*. 25, 351–361 (2003).

[37] Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H and Jürgens G: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free radical biology & medicine*. 13, 341–390 (1992).

[38] Ewing JF and Maines MD: Glutathione depletion induces heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein in rat brain. *Journal of neurochemistry*. 60, 1512–1519 (1993).

[39] Fairbairn DW, Olive PL and O'Neill KL: The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*. 339, 37–59 (1995).

[40] Fenton HJH: LXXIII. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 65, 899 (1894).

[41] Fernandez-Gonzalez A, Alex Mitsialis S, Liu X and Kourembanas S: Vasculoprotective effects of heme oxygenase-1 in a murine model of hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 302, 775–784 (2012).

[42] Fischer U, Jänicke RU and Schulze-Osthoff K: Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell death and differentiation*. 10, 76–100 (2003).

[43] Franek WR, Morrow DMP, Zhu H, Vancurova I, Miskolci V, Darley-Usmar K, Simms HH and Mantell LL: NF-kappaB protects lung epithelium against hyperoxia-induced nonapoptotic cell death-oncosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 37, 1670–1679 (2004).

[44] Frank L and Massaro D: Oxygen toxicity. *The American Journal of Medicine*. 69, 117–126 (1980).

[45] Frank L, Summerville J and Massaro D: Potection from oxygen toxicity with endotoxin. Role of the endogenous antioxidant enzymes of the lung. *The Journal of clinical investigation*. 65, 1104–1110 (1980).

[46] Freeman BA and Crapo JD: Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 47, 412–426 (1982).

[47] Fridovich I: Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*. 64, 97–112 (1995).

[48] Garat C, Jayr C, Eddahibi S, Laffon M, Meignan M and Adnot S: Effects of inhaled nitric oxide or inhibition of endogenous nitric oxide formation on hyperoxic lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 155, 1957–1964 (1997).

[49] Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasch SC, Borregaard N, Marrack P, Bratton DL and Henson PM: Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. 279, 21085–21095 (2004).

[50] Gerschmann R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P and Fenn WO: Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 119, 623–626 (1954).

[51] Gilbert DL, Gerschman R, Cohen J and Sherwood W: The Influence of High Oxygen Pressures on the Viscosity of Solutions of Sodium Desoxyribonucleic Acid and of Sodium Alginate1. *Journal of the American Chemical Society*. 79, 5677–5680 (1957).

[52] Gille JJ, Van Berkel CG and Joenje H: Mechanism of hyperoxia-induced chromosomal breakage in Chinese hamster cells. *Environmental and molecular mutagenesis*. 22, 264–270 (1993).

[53] Gille JJ and Joenje H: Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutation research*. 275, 405–414 (1992).

[54] Gille JJP and Joenje H: Chromosomal instability and progressive loss of chromosomes in HeLa cells during adaptation to hyperoxic growth conditions. *Mutation Research/DNAging*. 219, 225–230 (1989).

[55] Gilmore TD: Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 25, 6680–6684 (2006).

[56] Glasgow JN, Qiu J, Rassin D, Grafe M, Wood T and Perez-Pol JR: Transcriptional regulation of the BCL-X gene by NF-kappaB is an element of hypoxic responses in the rat brain. *Neurochemical research*. 26, 647–659 (2001).

[57] Gozzelino R, Jeney V and Soares MP: Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 50, 323–354 (2010).

[58] Gross A, McDonnell JM and Korsmeyer SJ: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*. 13, 1899–1911 (1999).

[59] Gwinn MR and Vallyathan V: Respiratory Burst: Role in Signal Transduction in Alveolar Macrophages. *Journal of Toxicology and Environmental Health,* 9, 27–39 (2006).

[60] Halliwell B: Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase. *Cell biology international reports*. 2, 113–128 (1978).

[61] Halliwell B: Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*. 141, 312–322 (2006).

[62] Halliwell B and Cross CE: Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives*. 102, 5-12, (1994).

[63] Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC: Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood*. 92, 3007–3017 (1998).

[64] Harada RN, Vatter AE and Repine JE: Macrophage effector function in pulmonary oxygen toxicity: hyperoxia damages and stimulates alveolar macrophages to make and release chemotaxins for polymorphonuclear leukocytes. *Journal of leukocyte biology*. 35, 373–383 (1984).

[65] Harrington HA, Ho KL, Ghosh S and Tung K: Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. *Theoretical Biology & Medical Modelling*. 5, 26 (2008).

[66] He CH, Gong P, Hu B, Stewart D, Choi ME, Choi AM and Alam J: Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *The Journal of biological chemistry*. 276, 20858–20865 (2001).

[67] Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT and Thompson CB: Bcl-xL Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria. *Cell*. 91, 627–637 (1997).

[68] Hibbs JBJ, Taintor RR, Vavrin Z and Rachlin EM: Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and biophysical research communications*. 157, 87–94 (1988).

[69] Hirano: Nitric oxide-mediated cytotoxic effects of alveolar macrophages on transformed lung epithelial cells are independent of the β2 integrin-mediated intercellular adhesion. *Immunology*. 93, 102–108 (1998).

[70] Hogg N and Kalyanaraman B: Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochimica et biophysica acta*. 1411, 378–84 (1999).

[71] Höffken G, Lorenz J, Kern W, T.Welte, Bauer T, Dalhoff K, Dietrich E, Ewig S, Gastmeier P, Grabein B, Halle E, Kolditz M, Marre R and Sitter H: Nichtinvasive und invasive Beatmung als Therapie der chronischen respiratorischen Insuffizienz S2-Leitlinie herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e . V . *Pneumologie*. 207–240 (2010).

[72] Höffken G, Lorenz J, Kern W, Welte T, Bauer T, Dalhoff K, Dietrich E, Ewig S, Gastmeier P, Grabein B, Halle E, Kolditz M, Marre R and Sitter H: Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society. *Pneumologie*. 63, 1–68 (2009).

[73] Imlay JA: Pathways of Oxidative Damage. *Annual Review of Microbiology*. 57, 395–418 (2003).

[74] Jamieson D, Chance B, Cadenas E and Boveris A: The Relation of Free Radical Production to Hyperoxia. *Annual Review of Physiology*. 48, 703–719 (1986).

[75] Janssens S and Tschopp J: Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell death and differentiation*. 13, 773–784 (2006).

[76] Jornot L and Junod AF: Variable glutathione levels and expression of antioxidant enzymes in human endothelial cells. *The American journal of physiology*. 264, 482–489 (1993).

[77] Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Dröge W and Schmitz ML: The pro- or anti-apoptotic function of NF-κB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *European Journal of Biochemistry*. 267, 3828–3835 (2000).

[78] Kang KW, Lee SJ and Kim SG: Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7, 1664–1673 (2005).

[79] Karin M: How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*. 18, 6867–6874 (1999).

[80] Kačergius T, Deng Y, Kuhn NS and Ambrozaitis A: Interferon-gamma does not restrict influenza virus replication in RAW 264 . 7 and AMJ2-C11 macrophages through the mechanism involving activation of inducible nitric oxide synthase expression. *Acta Medica Lituanica*. 15, 76–80 (2007).

[81] Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR: Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*. 26, 239–257 (1972).

[82] Khaw KS, Wang CC, Ngan Kee WD, Pang CP and Rogers MS: Effects of high inspired oxygen fraction during elective caesarean section under spinal anaesthesia on maternal and fetal oxygenation and lipid peroxidation. *British journal of anaesthesia*. 88, 18–23 (2002).

[83] Khoshnan A, Tindell C, Laux I, Bae D, Bennett B and Nel AE: The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4+ lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 165, 1743–1754 (2000).

[84] Kleinert H, Schwarz PM and Förstermann U: Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Biological Chemistry*. 384, 1343–1364 (2003).

[85] Knight PR and Holm BA: The three components of hyperoxia. *Anesthesiology*. 93, 3–5 (2000).

[86] Kobayashi H, Sakashita N, Okuma T, Terasaki Y, Tsujita K, Suzuki H, Kodama T, Nomori H, Kawasuji M and Takeya M: Class A scavenger receptor (CD204)

attenuates hyperoxia-induced lung injury by reducing oxidative stress. *The Journal of pathology*. 21, 38–46 (2007).

[87] Koßobutzki C: *Die Geschichte der inhalativen Sauerstofftherapie in Deutschland*. Universität Lübeck (2009).

[88] Kroemer G, Dallaporta B and Resche-Rigon M: The Mitochondrial Death/Life Regulator in Apoptosis and Necrosis. *Annual Review of Physiology*. 60, 619–642 (1998).

[89] Kumari S, Rastogi RP, Singh KL and Singh SP: Review article : DNA Damage : Detection Stratgies. *EXCLI Journal,* 44–62 (2008).

[90] Lamb NJ, Gutteridge JM, Baker C, Evans TW and Quinlan GJ: Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. *Critical care medicine*. 27, 1738–1744 (1999).

[91] Lambrecht BN: Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity*. 24, 366–368 (2006).

[92] Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A and Abraham NG: Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91, 5987–5991 (1994).

[93] Li N and Karin M: Is NF-κB the sensor of oxidative stress? *The FASEB Journal*. 13, 1137–1143 (1999).

[94] Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong W-S, Yu S and Kong A-N: Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF-κB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochemical pharmacology*. 76, 1485–1489 (2008).

[95] Li Y, Zhang W, Mantell LL, Kazzaz JA, Fein AM and Horowitz S: Nuclear factor-kappaB is activated by hyperoxia but does not protect from cell death. *The Journal of biological chemistry*. 272, 20646–20649 (1997).

[96] Liao JK, Zulueta JJ, Yu FS, Peng HB, Cote CG and Hassoun PM: Regulation of bovine endothelial constitutive nitric oxide synthase by oxygen. *The Journal of clinical investigation*. 96, 2661–2666 (1995).

[97] Lindahl SGE and Mure M: Dosing Oxygen: A Tricky Matter or a Piece of Cake? *Anesthesia & Analgesia*. 95, 1472–1473 (2002).

[98] Lines MC, Palleroni A V, Varesio L, Wright RB and Brunda MJ: Tumoricidal alveolar macrophage and tumor infiltrating. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 49, 296-302. (1991).

[99] Liu G-H, Qu J and Shen X: NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochimica et biophysica acta*. 1783, 713–727 (2008).

[100] Lorch SA, Foust R 3rd, Gow A, Arkovitz M, Salzman AL, Szabo C, Vayert B, Geffard M and Ischiropoulos H: Immunohistochemical localization of protein 3-nitrotyrosine and S-nitrosocysteine in a murine model of inhaled nitric oxide therapy. *Pediatric research*. 47, 798–805 (2000).

[101] Magnussen H, Kirsten A-M, Köhler D, Morr H, Sitter H and Worth H: Guidelines for long-term oxygen therapy. German Society for Pneumology and Respiratory Medicine. *Pneumologie*. 62, 748–756 (2008).

[102] Maines MD: Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *The FASEB Journal*. 2, 2557–2568 (1988).

[103] Maines MD: The Heme Oxygenase System: A Regulator of Second Messenger Gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 37, 517–554 (1997).

[104] Martinou J-C and Youle RJ: Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. *Developmental Cell*. 21, 92–101 (2011).

[105] McIlroy D, Sakahira H, Talanian R V and Nagata S: Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. *Oncogene*. 18, 4401–4408 (1999).

[106] Müller JM, Rupec RA and Baeuerle PA: Study of Gene Regulation by NF-κB and AP-1 in Response to Reactive Oxygen Intermediates. *Methods*. 11, 301–312 (1997).

[107] Nagata S: Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research*. 256, 12–18 (2000).

[108] Narasaraju TA, Jin N, Narendranath CR, Chen Z, Gou D and Liu L: Protein nitration in rat lungs during hyperoxia exposure: a possible role of myeloperoxidase. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 285, 1037–1045 (2003).

[109] Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS and Pickett CB: Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *The Journal of biological chemistry*. 280, 32485–32492 (2005).

[110] Olive PL and Banáth JP: Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Experimental cell research*. 221, 19–26 (1995).

[111] O'Reilly MA, Staversky RJ, Huyck HL, Watkins RH, LoMonaco MB, D'Angio CT, Baggs RB, Maniscalco WM and Pryhuber GS: Bcl-2 family gene expression during

severe hyperoxia induced lung injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 80, 1845–1854 (2000).

[112] Pagano A and Barazzone-Argiroffo C: Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1010, 405–416 (2003).

[113] Papaiahgari S, Zhang Q, Kleeberger SR, Cho H-Y and Reddy SP: Hyperoxia stimulates an Nrf2-ARE transcriptional response via ROS-EGFR-PI3K-Akt/ERK MAP kinase signaling in pulmonary epithelial cells. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8, 43–52 (2006).

[114] Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA and Darley-Usmar VM: Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1411, 385–400 (1999).

[115] Petrache I, Choi ME, Otterbein LE, Chin BY, Mantell LL, Horowitz S and Choi AM: Mitogen-activated protein kinase pathway mediates hyperoxia-induced apoptosis in cultured macrophage cells. *The American Journal of Physiology*. 277, 589–595 (1999).

[116] Pryor WA: Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes, and Reactions. *Annual Review of Physiology*. 48, 657–667 (1986).

[117] Przybyszewski WM, Kasperczyk J, Stokłosa K and Bkhiyan A: DNA damage induced by products of lipid peroxidation. *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej (Online)*. 59, 75–81 (2005).

[118] Qiao-wen X and Nathan C: The high-output nitric oxide pathway : role and regulation. *Journal of leukocyte biology*. 56, 576–582 (1994).

[119] Quan Y-F, Zheng M-C, Zhang H, Zhang P-L and Zhang H: Expression of heme oxygenase-1 and inducible nitric oxide synthase in the lungs of hyperoxia-exposed preterm rats. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics*. 13, 577–580 (2011).

[120] Quinlan T, Spivack S and Mossman BT: Regulation of antioxidant enzymes in lung after oxidant injury. *Environmental health perspectives*. 102, 79–87 (1994).

[121] Ratovitski EA, Bao C, Quick RA, McMillan A, Kozlovsky C and Lowenstein CJ: An inducible nitric-oxide synthase (NOS)-associated protein inhibits NOS dimerization and activity. *The Journal of biological chemistry*. 274, 30250–30257 (1999).

[122] Reddy NM, Kleeberger SR, Kensler TW, Yamamoto M, Hassoun PM and Reddy SP: Disruption of Nrf2 impairs the resolution of hyperoxia-induced acute lung injury and inflammation in mice. *Journal of Immunology* 182, 7264–7271 (2009).

[123] Romashko J 3rd, Horowitz S, Franek WR, Palaia T, Miller EJ, Lin A, Birrer MJ, Scott W and Mantell LL: MAPK pathways mediate hyperoxia-induced oncotic cell death in lung epithelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 35, 978–993 (2003).

[124] Ryter SW and Choi AMK: Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxidants & redox signaling*. 7, 80–91 (2005).

[125] Schreck R, Rieber P and Baeuerle PA: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO Journal*. 10, 2247–2258 (1991).

[126] Seixas E, Gozzelino R, Chora Â, Ferreira A, Silva G, Larsen R, Rebelo S, Penido C, Smith NR, Coutinho A and Soares MP: Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 15837-15842 (2009).

[127] Shea LM, Beehler C, Schwartz M, Shenkar R, Tuder R and Abraham E: Hyperoxia activates NF-kappaB and increases TNF-alpha and IFN-gamma gene expression in mouse pulmonary lymphocytes. *Journal of immunology* 157, 3902–3908 (1996).

[128] Shringarpure R and Davies KJA: Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 32, 1084–1089 (2002).

[129] Sies H: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 82, 291–295 (1997).

[130] Sies H: Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 215, 213–219 (1993).

[131] Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175, 184–191 (1988).

[132] Smith JL: The Influence of Pathological Conditions on Active Absorption of Oxygen by the Lungs. *The Journal of Physiology*. 22, 307–318 (1898).

[133] Smith JL: The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *The Journal of Physiology*. 24, 19–35 (1899).

[134] Souza-Pinto NC de, Eide L, Hogue BA, Thybo T, Stevnsner T, Seeberg E, Klungland A and Bohr VA: Repair of 8-Oxodeoxyguanosine Lesions in Mitochondrial DNA Depends on the Oxoguanine DNA Glycosylase (OGG1) Gene and 8-Oxoguanine Accumulates in the Mitochondrial DNA of OGG1-defective Mice. *Cancer Research*. 61, 5378–5381 (2001).

[135] Srivastava KK, Cable EE, Donohue SE and Bonkovsky HL: Molecular basis for heme-dependent induction of heme oxygenase in primary cultures of chick embryo

hepatocytes. Demonstration of acquired refractoriness to heme. *European journal of biochemistry / FEBS*. 213, 909–917 (1993).

[136] Stenger MR, Rose MJ, Joshi MS, Rogers LK, Chicoine LG, Bauer JA and Nelin LD: Inhaled nitric oxide prevents 3-nitrotyrosine formation in the lungs of neonatal mice exposed to >95% oxygen. *Lung*. 188, 217–227 (2010).

[137] Stilmann M, Hinz M, Arslan SÇ, Zimmer A, Schreiber V and Scheidereit C: A Nuclear Poly(ADP-Ribose)-Dependent Signalosome Confers DNA Damage-Induced IκB Kinase Activation. *Molecular Cell*. 36, 365–378 (2009).

[138] Szabó C, Ischiropoulos H and Radi R: Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*. 6, 662–680 (2007).

[139] Szabó C and Salzman AL: Endogenous peroxynitrite is involved in the inhibition of mitochondrial respiration in immuno-stimulated J774.2 macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*. 209, 739–743 (1995).

[140] Tian Z, Zhang Z, Li Y, Zhao S and Wang X: Protection of hyperoxia-induced lung injury by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via RAGE-NF-κB signaling pathway in newborn rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 91, 2143–2147 (2011).

[141] Toledano MB and Leonard WJ: Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88, 4328–4332 (1991).

[142] Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E and Croce CM: The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*. 229, 1390–1393 (1985).

[143] Turrens JF, Freeman B and Crapo JD: Hyperoxia increases H2O2 release by lung mitochondria and microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*. 217, 411–421 (1982).

[144] Wang J, Xing SS, Guo SB, Jin W and Zhang W: Oxidative dna damage of lymphocytes in peripheral blood and ascites in cancer patients. *Current Oncology*. 19, 10–14 (2012).

[145] Waxman AB, Mahboubi K, Knickelbein RG, Mantell LL, Manzo N, Pober JS and Elias JA: Interleukin-11 and interleukin-6 protect cultured human endothelial cells from H2O2-induced cell death. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 29, 513–522 (2003).

[146] Wu Z-H, Shi Y, Tibbetts RS and Miyamoto S: Molecular Linkage Between the Kinase ATM and NF-κB Signaling in Response to Genotoxic Stimuli. *Science*. 311, 1141–1146 (2006).

[147] Xie QW, Whisnant R and Nathan C: Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine*. 177, 1779–1784 (1993).

[148] Zhang X, Shan P, Sasidhar M, Chupp GL, Flavell RA, Choi AMK and Lee PJ: Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 28, 305–315 (2003).

[149] Zhou H, Imrich A and Kobzik L: Characterization of immortalized MARCO and SR-AI/II-deficient murine alveolar macrophage cell lines. *Particle and fibre toxicology*. 5, 7 (2008).

[150] Zhuang JC, Lin C, Lin D and Wogan GN: Mutagenesis associated with nitric oxide production in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95, 8286–8291 (1998).

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie den Herren Prof. Dr. Dr. Peter Radermacher und Prof. Dr. Enrico Calzia für die Überlassung des Themas, die vielfältige Unterstützung und die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Arbeit und der Planung der Experimente.

Prof. Radermacher stand bei allen Fragen und Problemen als Ansprechpartner zur Verfügung und war so eine unverzichtbare Hilfe in allen Phasen der Arbeit. Ich danke Herrn PD Dr. Florian Wagner für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Experimente durchführen zu dürfen und für seine wertvollen Hinweise und Anregungen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen – auch nicht namentlich erwähnten- tollen Mitarbeitern der Sektion bedanken. Sie haben sich immer für mich eingesetzt und mir unermüdlich, tatkräftig und geduldig bei der täglichen Laborarbeit zur Seite gestanden. Hervorheben möchte ich José Matallo, Oscar McCook, Michael Gröger und Ulrich Wachter, besonders aber Bettina Stahl und Rosemarie Mayer, welche mich über lange Zeit Seit an Seit haben arbeiten lassen. Dabei haben sie mich stets unterstützt und ermuntert.

Weiterer Dank geht an Martina Bluhm, welche sich freiweillig bereit erklärt hat, mir zur helfen und mich unermüdlich perfekt beraten und korrigiert hat. Peter Flaig war stets eine Hilfe und spornte mich an. Vor allem Florian Balling möchte ich danken, welcher lange Zeit mit mir im Labor gearbeitet und mir die Zeit versüßt hat, wie es nur ein wahrer Freund kann.

Mein für mich wichtigster Dank geht an meinen Vater, der mir durch seine Großzügigkeit meine Ausbildung ermöglicht hat, sowie meiner ganzen Familie und meiner Freundin Sonja für die Unterstützung, Motivation und Beratung während der langen Zeit.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.