Universität Ulm

Universitätsklinik für Anästhesiologie
Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung
Sektionsleiter: Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. Peter Radermacher

# Auswirkung von normobarer Hyperoxie auf die mitochondriale Atmung von Alveolarmakrophagen

## Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von:
Ulf Bastian Bock
aus Stuttgart

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Enrico Calzia

2. Berichterstatter: PD Dr. Andrea Formentini

Tag der Promotion: 18.12.2015

Abkürzungsverzeichnis ..... IV
1. Einleitung ..... 6
1.1 Sauerstoff in der Medizin ..... 6
1.2 Sauerstofftoxizität ..... 6
1.3 Reaktive Sauerstoffspezies ..... 6
1.4 Schäden durch oxidativen Stress ..... 9
1.3 Zielsetzung ..... 11
2. Material und Methoden ..... 13
2.1 Verwendete Materialien und Geräte ..... 13
2.2 Methodik ..... 17
3. Ergebnisse ..... 36
3.1 Protokoll „Standard“ ..... 36
3.2. Hyperoxie ohne Oligomycin ..... 40
3.3 Hyperoxie bei 25°C ..... 42
3.4 Protokoll: „Complex-entkoppelt“ ..... 44
3.5 Protokoll: „Complex-ADP“ ..... 49
3.6 Auswirkung der Kopplung auf die Kapazität ..... 54
3.7 Zusammenfassung ..... 57
4. Diskussion ..... 58
4.1 Übersicht ..... 58
4.2 Messung mit dem Oxygraph 2k ..... 59
4.3 Zellmodell ..... 60
4.4 Beeinträchtigung unter normobarer Hyperoxie ..... 62
4.5 Schlussfolgerung ..... 64
5. Zusammenfassung ..... 66
Literaturverzeichnis ..... 67
Anhang ..... 80

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | Bovine Serum Albumine |
| $CO_2$ | Kohlenstoffdioxid |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPBS | Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline |
| EGTA | Ethylene Glycol tetraacetic acid |
| ETS | Elektronen Transfer System |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| FCCP | Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon |
| g | Gramm |
| h | Stunden |
| $H_2O_2$ | Wasserstoffperoxid |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure |
| IMM | Innere Mitochondrien Membran |
| l | Liter |
| L | Leckageatmung |
| M | Molar |
| MEMNEAA | Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids |
| mg | Milligramm |
| MiR05 | Mitochondrial Respiration Medium |
| ml | Milliliter |
| µl | Mikroliter |
| mM | Millimol |
| mosm | Osmolarität |
| $Na_2S$ | Natriumsulfat |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |

| | |
|---|---|
| NEAA | Non Essential Amino Acid |
| $NO^{\bullet}$ | Stickstoffmonoxid |
| Oxphos | Oxidative Phosphorylierung |
| $^1O_2$ | Singulette-Sauerstoff |
| $O_2$ | Sauerstoff |
| $O_2^{-\bullet}$ | Superoxidradikalanionen |
| $OH^{\bullet}$ | Hydroxylradikale |
| PEEK | Polyetheretherketon |
| pmol | Picomol |
| P/E-Ratio | Phosphorylation Control Ratio |
| POS | Polarographischer Sauerstoffsensor |
| Q | Ubichinon |
| R | Routine Atmung |
| RNS | Reaktive Stickstoffspezies |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| ROX | Residual Oxygen Consumption |
| s | Sekunde |
| TMPD | Tetramethylphenylendiamin |
| U/min | Umdrehung pro Minute |

# 1. Einleitung

## *1.1 Sauerstoff in der Medizin*

Sauerstoff wurde erstmals im 18. Jahrhundert mit therapeutischer Zielsetzung eingesetzt. [72] Zunächst bedurfte es vieler Erfahrungen, bis dann zu Beginn des 20. Jahrhunderts der Durchbruch gelang und Sauerstoff als Basistherapeutikum eingesetzt wurde. [63, 88]

Sauerstoff hat auch in der heutigen Medizin weiterhin einen festen Stellenwert.

So wird Sauerstoff als Medikament präklinisch im Rettungsdienst als Grundlage der Notfallversorgung, wie zum Beispiel zur Reanimation und Polytraumaversorgung eingesetzt. [3, 24, 71] Auch in der Klinik wird Sauerstoff bei der Therapie von Hypoxämie, bei Pneumonie, chronisch respiratorischer Insuffizienz, bei $SpO_2$ Werten von 90% und kleiner und in der Langzeittherapie der COPD eingesetzt. [49, 72, 91]

## *1.2 Sauerstofftoxizität*

Schon bald nach dem Durchbruch der Sauerstofftherapie wurden die ersten schädlichen Einflüsse durch Hyperoxie bekannt. [16] Sauerstoff wird deshalb heute auch als potentiell schädlich eingestuft. [73] Trotz ihres Nutzens wird die Sauerstofftherapie mehr und mehr kontrovers diskutiert. [12, 21, 51, 66, 70, 74] So zeigte sich beispielsweise ein Zusammenhang der Mortalität von Patienten auf der Intensivstation mit einem hohen $FiO_2$. [25] Desweiteren konnte nach 6 – 24-stündiger an gesunden Probanden eine Toxizität durch Sauerstoff an der Lunge nachgewiesen werden. [18, 75] Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass normobare Hyperoxie selbst nicht gentoxisch ist. [34]

## *1.3 Reaktive Sauerstoffspezies*

Man weiß heute, dass für den toxischen Charakter des Sauerstoffs vor allem Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$), Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$), Superoxidradikalanionen ($O_2^{-\bullet}$) und Lipidoxide verantwortlich sind. [56, 59, 88] Diese hoch aktiven Substanzen bezeichnet man zusammen als Reaktive Sauerstoffspezies (ROS). [49] Sie alle werden vermehrt unter Hyperoxie gebildet. [14, 29]

**Tabelle 1: Biologisch relevante freie Radikale und verwandte Moleküle. Als freie Radikale sind alle Atome oder Moleküle definiert, die mindestens ein ungebundenes Elektron besitzen.** [103]

| Freie Radikale | Symbol | Nicht-Radikal | Symbol |
|---|---|---|---|
| Superoxidradikalanion | $O_2^{-\bullet}$ | Wasserstoffperoxid | $H_2O_2$ |
| Hydroxylradikal | $OH^\bullet$ | Singulett Sauerstoff | $^1O_2$ |
| Peroxylradikal | $ROO^\bullet$ | Hydroperoxid | ROOH |
| Alkoxylradikal | $RO^\bullet$ | Ozon | $O_3$ |
| Stickstoffmonoxid | $NO^\bullet$ | Peroxinitrit | ONOOH |

Zu den ROS werden außerdem die reaktiven Stickstoffspezies (RNS) gezählt. [97] Stickstoffmonoxid ($NO^\bullet$) spielt als ein recht stabiles Radikal eine wichtige Rolle. [27] Die wichtigste Quelle für ROS ist das Mitochondrium. [76] Wegen dessen hoher Kapazität als Elektronenakzeptor nimmt Sauerstoff dabei eine zentrale Rolle in der mitochondrialen Atmung ein und führt dort zur Radikalbildung. [17, 66, 67]

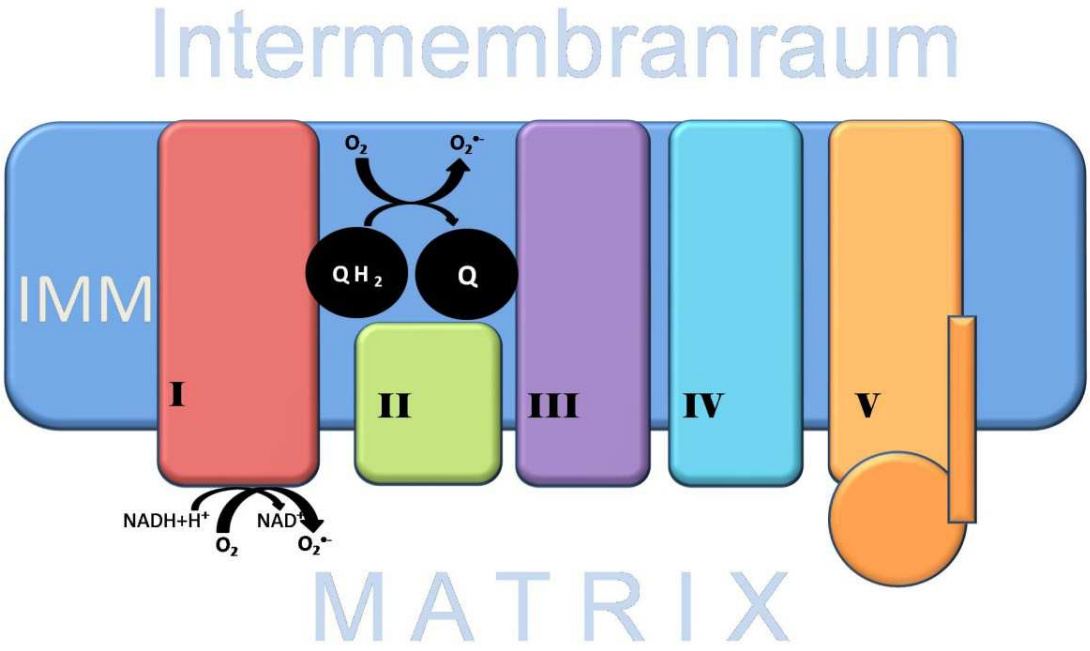


**Abbildung 1: Radikal-Produktion im Mitochondrium: Superoxidradikalanionen ($O_2^{-\bullet}$) werden von der Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase an Komplex I der inneren Mitochondrienmembran (IMM) durch die Bindung eines Elektrons an Sauerstoff ($O_2$) gebildet. Sie können auch alternativ auch an Komplex II und III durch Autooxidation des Ubichinol ($QH_2$) zum Ubiquinon (Q) entstehen.** [64]

Hauptquelle der Radikalbildung in der Atmungskette oder auch Elektronentransportkette sind Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und Komplex III (Cytochrom C Reduktase). [12, 15, 75, 85, 104] Im physiologischen Milieu besteht ein Steady-State zwischen der Bildung von ROS und deren Abbau durch das antioxidative System. Werden mehr Radikale gebildet als abgebaut, spricht man von oxidativem Stress. [81, 82] Zum einen konnte gezeigt werden, dass es unter Hyperoxie zu oxidativem Stress kommen kann, zum anderen werden ROS auch physiologisch gebildet. [56, 59] So macht sich zum Beispiel die Immunabwehr den oxidativen Stress zu Nutze. [5] Phagozytäre Zellen, wie Makrophagen, setzen beispielsweise durch die NADPH-Oxidase Superoxidradikalanionen ein um den Prozess der Phagozytose zu katalysieren. [27, 43, 47, 54] Unter Einfluss von Hyperoxie konnte in verschiedenen Untersuchungen Schäden an Lungengewebe beobachtet werden. [2, 13, 60] Dabei konnte gezeigt werden, dass Alveolarmakrophagen dabei eine wichtige Rolle spielen. [13, 48] Im Rahmen der Immunantwort nehmen sie einen großen Einfluss auf das umgebende Lungengewebe. [71] Unter Abwesenheit der Phagozyten konnte dabei kein Schaden durch oxidativen Stress nachgewiesen werden. [8]

## *1.4 Schäden durch oxidativen Stress*

Reaktive Sauerstoffspezies sind an vielen biologischen Vorgängen ursächlich beteiligt. So kommt es unter oxidativem Stress zu Alterungsprozessen, Mutationen, Arteriosklerose, Entzündungsprozessen, Diabetes Mellitus und neurodegenerativen Erkrankungen. [51, 78, 86] Dabei greifen Sauerstoffradikale, wie im Folgenden beschrieben, an verschiedensten Stellen der Zellen an.

### 1.4.1 Proteine

Proteine werden unter Einfluss der ROS und der freien Radikale oxidiert. [7] Ein Beispiel für die Oxidation von Proteinen ist die Nitrierung von Tyrosin zu 3-Nitrothyrosin unter oxidativem Stress. [17] Die Nitrierung durch Peroxinitrit gilt auch als Hinweis für DNA Schäden. [1] Peroxinitrit wurde deshalb auch als Mutagen eingestuft. [109] Außerdem kommt es zu Quervernetzungen unter Proteinen und zwischen Proteinen und DNA und damit zum Funktionsverlust der Zelle. [5, 22] Intrazellulär kann es dabei zu Akkumulation von funktionslosen Proteinen kommen. [95]

### 1.4.2 DNA

An der DNA kommt es durch oxidativen Stress zu Basenmodifikationen. Daran haben vor allem Hydroxylradikale und Peroxinitrit einen großen Anteil. [45, 87] Dabei ist die Bandbreite der Schäden sehr weit und es konnten viele unterschiedliche Basenschäden an der DNA entdeckt werden. [19, 20]

### 1.4.3 Lipide

Ungesättigte Fettsäuren werden durch ROS ebenfalls oxidiert und lösen einen Teufelskreis aus. Bei der Lipidperoxidation werden die ungesättigten Fettsäuren oxidiert und bilden dabei Lipidradikale. [30] Diese oxidieren wiederum weitere ungesättigte Fettsäuren und richten außerdem noch Schäden an Zellmembran und DNA an. [56]

### 1.4.4 Mitochondrien

Die gebildeten ROS besitzen ein hohes energetisches Niveau. Sie sind deshalb sehr reaktiv und induzieren oxidativen Stress. Sie verursachen dadurch auch Schäden an den Enzymen der Atmungskette selbst. Die NADH-Dehydrogenase und die Succinat-Dehydrogenase können dabei den Ausfall des jeweils anderen Enzyms zumindest teilweise kompensieren. Schwieriger ist es hingegen bei anderen Enzymen der Atmungskette, wie der Cytochrom C Reduktase und der ATP-Synthase. Ihr totaler Ausfall wäre nicht zu kompensieren. [79, 83]

Die ATP-Synthese würde deshalb bei großen Defekten der inneren Mitochondrienmembran durch einen Verlust der aufgebauten Spannung verringert werden oder zum Erliegen kommen. [55, 62]

### 1.4.5 Apoptose

Desweiteren führt der oxidative Stress zu Strangbrüchen der DNA, Lipidperoxidation, Proteinoxidation, zu Akkumulation von Kalzium und einer starken Aktivierung des Immunsystems mit Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und daraufhin zu einer Aktivierung des Komplementsystems. [10, 52, 57, 73]

Durch Schäden an der inneren Mitochondrienmembran wird daraufhin vermehrt Cytochrom C in das Zytosol freigesetzt. Dadurch kann sowohl die Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung beeinträchtigt sein, als auch Vorgänge der Apoptose in Gang gesetzt werden, die zum Zelltod führen. [63, 73]

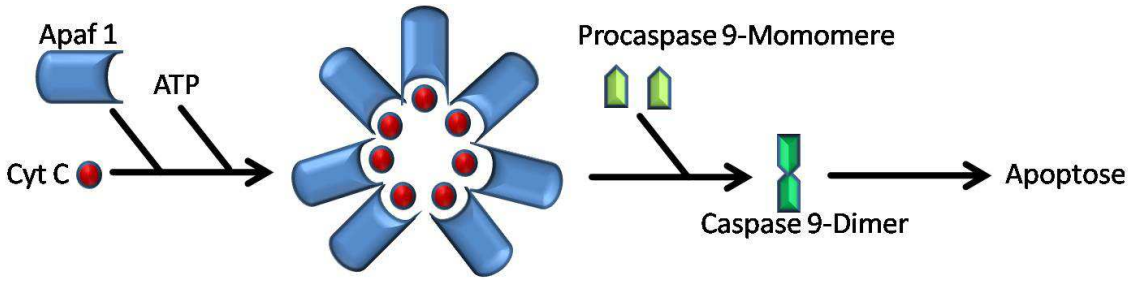


**Abbildung 2: Apoptoseinduktion durch Cytochrom C (Cyt C): Freies Cytochrom C bindet an das Apoptoic protease-activating factor-1 Protein (Apaf 1) im Zytosol. Dabei kommt es zu einer Oligomerisierung der Apaf 1-Proteine zu einem Apoptosom unter Hilfe von Adenosintriphosphat-abhängigen (ATP). Daraufhin folgt die Aktivierung der Initiatorcaspase 9 über Dimerisierung von Procaspase 9-Monomeren. Dadurch wird eine proteolytische Aktivierung der Effektorcaspasen (zum Beispiel Caspase 3 und 7) möglich, die zur Apoptose führt.**

## *1.3 Zielsetzung*

In dieser Studie soll die Auswirkung von normobarer Hyperoxie auf Alveolarmakrophagen vom Typ AMJ2-C11 untersucht werden. Primäres Ziel war es dabei ein Modell zu schaffen, welches die Fragestellung ausreichend klären kann.

In vorrangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Hyperoxie Einfluss auf die mitochondriale Atmung von Zellen hat und sich die hyperoxiebedingten Veränderungen gut quantifizieren lassen. [9, 85, 91] Allerdings wurden die Untersuchungen zum Thema der Hyperoxie an Zellen häufig abseits ihrer biologischen Funktion durchgeführt. Es wurde, wie bei Kelly et al. oder Nabben et al. meist an isolierten Mitochondrien [65, 80] oder wie bei Scatena et al. an lysierten Zellen gearbeitet. [91] Dabei kommt es durch die Isolierung der Mitochondrien aus der Zelle sowohl zu Schäden, wie auch zu einer Selektion der robusteren Mitochondrien. Außerdem müssen die Bedingungen des Experiments penibel überwacht und das Milieu streng kontrolliert werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass Versuche an intakten Zellen eine größere physiologische Relevanz besitzen und dabei deutlich weniger Artefakte auftreten. [11]

Diese Studie sollte deshalb, anders als die vorangegangenen, möglichst nahe an der physiologisch vitalen Zelle durchgeführt werden. Als Methodik wurde deshalb ein In-vitro-Versuch gewählt, in dem das Augenmerk auf die mitochondriale Atmung als Parameter der Auswirkung normobarer Hyperoxie gerichtet wurde. Alveolarmakrophagen eignen sich dabei als Zellmodell besonders, da sie eine wichtige Rolle in der Genese freier Radikale und den durch diese bedingten Stress spielen. [13, 27] Sie bilden, als Zellen der Immunabwehr, selbst ROS und sind auch selbst primäres Ziel von oxidativem Stress. [52, 93] Alveolarmakrophagen sind in der Lunge ständig höheren Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt als andere Zellen des Körpers. Deshalb versetzt eine Exposition mit Sauerstoff die Alveolarmakrophagen tatsächlich in einen Zustand der Hyperoxie, während für eine Zelle der Körperperipherie, wie zum Beispiel einen Gewebemakrophagen, normale Raumluft mit 21% Sauerstoffanteil bereits ein Zustand der Hyperoxie darstellen würde.

Die Expositionsdauer wurde auf 24 Stunden festgelegt, da in anderen Studien nach 24-stündiger Exposition mit Sauerstoff signifikante Veränderungen des Zellstoffwechsels, Anstieg des oxidativen Stresses, Reduktion der Zellzahl und Zellzyklusarrest auftraten. [81, 82, 105]

So sollten mit der Untersuchung folgende Fragen geklärt werden:

1. Beeinflusst eine normobare Hyperoxie von 24 Stunden die mitochondriale Atmungsaktivität?

2. Sind die Effekte auf die einzelnen Komplexe unterschiedlich?

3. Beeinflusst eine normobare Hyperoxie von 24 Stunden die Kopplung der Atmungskette an die oxidative Phosphorylierung?

# 2. Material und Methoden

## *2.1 Verwendete Materialien und Geräte*

### 2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

- Ampuwa — Fresenius, Bad Homburg
- Antibiotika
  - Gentamicinsulfat — Merck, Darmstadt
- Antimycin A — Sigma-Aldrich, Hamburg
- Ascorbat — Sigma-Aldrich, Hamburg
- Cytochrom C — Sigma-Aldrich, Hamburg
- Desinfektionsmittel
  - Isoseptol Flächendesinfektion — Apotheke Universität Ulm, Ulm
- DMEM — Gibco, Auckland, USA
- DPBS — Gibco, Auckland, USA
- Ethanol 99,8% — Apotheke Universität Ulm, Ulm
- Fetales Kälberserum — PAA, Pasching, Österreich
- Glutamat
  - Glutamax — Gibco, New York, USA
- Kohlendioxid — MTI Industriegase, Ulm
- Malat — Sigma-Aldrich, Hamburg
- MiR05 — Fresenius, Bad Homburg
- Na2S — Sigma-Aldrich, Hamburg
- Natriumpyruvat — Sigma-Aldrich, Hamburg
- NEAA — Gibco, New York, USA
- Oligomycin — Sigma-Aldrich, Hamburg
- Rotenon — Sigma-Aldrich, Hamburg
- Saponin — Fluka, Steinheim
- Sauerstoff — MTI Industriegase, Ulm
- Stickstoff (gasförmig) — MTI Industriegase, Ulm
- Succinat — Sigma-Aldrich, Hamburg
- TMPD — Sigma-Aldrich, Hamburg
- Trypanblau — Biochrom AG, Berlin

### 2.1.2 Laborgeräte

| | |
|---|---|
| • Computer | |
| Dell Optiplex | Dell, Texas, USA |
| • Eismaschine | |
| Scotsman B-190 | Frimont, Mailand, Italien |
| • Expositionskammer | |
| Eigenbau | Universität Ulm, Ulm |
| • Inkubatoren | |
| Heracell 150i | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Heraeus Vacutherm | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| • Kühlschränke | |
| Comfort, Premium Supercool | Liebherr, Bulle, Schweiz |
| • Mikroskope | |
| CKX41 | Olympus, Tokyo, Japan |
| Motic B3 Professional | Motic, Wetzlar |
| • Pipettierhelfer | |
| Marcro | Brand, Wertheim |
| Pipetboy acu | Integra, Fernwald |
| Pipetus akku | Hirschmann, Eberstadt |
| • Respirometer | |
| Oxygraph-2k | Oroboros, Insbruck, Österreich |
| • Injektionskanülen | |
| Gastight #1701, 10µl | Hamilton, Bonaduz, Schweiz |
| Gastight #1702, 25µl | Hamilton, Nevada, USA |
| Gastight #1705, 50µl | Hamilton, Bonaduz, Schweiz |
| • Sterilbank | |
| MSC Advantage | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| • Vortex Mixer | Scientific Industries, New York, USA |
| • Wasserbad | GFL, Burgwedel |
| • Zählkammer | |
| Hemozytometer | Brand, Wertheim |
| • Zentrifugen | |
| Centrifuge 5804-R | Eppendorf, Hamburg |

### 2.1.3 Software

| | |
|---|---|
| • Datalab 4 | Oroboros, Insbruck, Österreich |
| • Mendeley Desktop 1.8 | Mendeley, London, UK |
| • Microsoft Office 2007 | Microsoft, Redmond, USA |
| • SPSS Statistics 20 | SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA |
| • Zotero 4 | GeorgeMason-University, Fairfax, USA |

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|---|
| • Bechergläser | |
| 100ml, 600ml | Duran, Mainz |
| • Blasenspritze | |
| Omnifix 60ml, 100ml | Braun, Melsungen |
| • Cell Scraper | Greiner, Frickenhausen |
| • Dreiwegehahn | |
| Discofix-3 | Braun, Melsungen |
| • Einmalhandschuhe | |
| Peha Soft Nitril | Hartmann, Heidenheim |
| • Falcon Tubes | |
| Cellstar | Greiner, Frickenhausen |
| • Labortücher | Kimtech, Reigate, UK |
| • Pipetten Eppendorf | Eppendorf, Hamburg |
| 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl, 500-2500µl | |
| • Pipettenspitze Eptips | |
| 20µl, 100µl, 1000µl, 2500µl | Eppendorf, Hamburg |
| • Plastikpipetten | |
| Cellstar 10ml, 25ml | Corning, New York, USA |
| • Reagiergefäß | |
| Microtube 0,5ml | Sarstedt, Nümbrecht |
| • Zellkulturflasche | |
| Nunc | Roskild, Dänemark |

### 2.1.5 Zellen

- Alveolar Makrophagen

| | |
|---|---|
| AMJ2-C11 macrophage cell lines (ATCC: CRL-2456) | American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA |

## *2.2 Methodik*

### 2.2.1 Zellkultivierung

Zur Anzucht der Alveolarmakrophagen (AMJ2-C11) wurde ein Nährmedium hergestellt. Ein Tropfen der in Lösung gebrachten Zellen wurden an der Sterilbank zusammen mit 10ml Nährmedium in eine Zellkulturflasche gegeben und im Inkubator bei 37°C in einer Normalatmosphäre mit 21% $O_2$ und 5% $CO_2$ kultiviert. Zur Erhaltung einer konstanten Population mit gleichmäßiger Zelldichte wurden die Zellen alle drei bis vier Tage bei 80% – 90% Konfluenz in eine neuangesetzte Nährlösung passagiert.

**Tabelle 2: Zusammensetzung des eingesetzten Nährmediums zur Zellaufzucht der Alveolarmakrophagen. Das Nährmedium enthält Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Calf Serum (FCS), Glutamat, Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids (MEMNEAA) und das Aminoglycosidantibiotikum Refobacin (Gentamicin).**

| | |
|---|---|
| DMEM | 500 ml |
| FCS | 50 ml |
| Glutamax | 5 ml |
| MEMNEAA | 5 ml |
| Defobacin | 0,5 ml |

### 2.2.2 Sauerstoffexposition

Da die verwendeten Alveolarmakrophagen normalen Luftsauerstoff gewöhnt sind, konnte normale Raumluft nicht als Hyperoxiemodell verwendet werden. [35] Für das Hyperoxiemodell wurde deshalb eine Atmosphäre mit 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid verwendet. Die Zellkulturflaschen der Hyperoxiegruppe wurden zur Sauerstoffexposition in die Expositionskammer mit 7,2l Volumen untergebracht. Diese wurde luftdicht verschlossen und unter normobaren Bedingungen mit dem zehnfachen Kammervolumen an Sauerstoff gespült. Danach wurde 360ml $CO_2$ in die Kammer eingemischt um eine Atmosphäre mit 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid zu erreichen. Zur Kontrolle einer konstanten Gas-Konzentration wurde das Gasgemisch mit Luftprobenahmen stets auf den Anteil von $CO_2$ und $O_2$ überprüft. Die Alveolarmakrophagen wurden dann in der Expositionskammer für 24h bei 37°C inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde jeweils parallel dazu mit 21% $O_2$ und 5% $CO_2$ inkubiert.

### 2.2.3 Messinstrument: Oxygraph-2k

Es ist bekannt, dass geringfügige mitochondriale Defekte signifikante Unterschiede in den Effekten von Atmungsketteninhibitoren, Veränderungen der Zellatmung und damit auch Änderungen in Atmungsparametern nach sich ziehen. [39] Deshalb wurde zur Messung der Wirkung von Hyperoxie auf Alveolarmakrophagen der Oxygraph-2k eingesetzt. Es handelte sich hierbei um ein hochauflösendes 2-Kammer-Titrations-Respirometer. In zwei Glaskammern mit einem Volumen von jeweils 2ml konnten getrennt von einander zwei Zellproben gleichzeitig untersucht werden. Die Kammern waren in einen Kupferblock zur Temperaturregulation eingebettet und wurden mit einem Verschlussstopfen versehen. Im Stopfen war eine Titan Kapillare eingelassen, durch die man mit Injektionskanülen Substanzen in die Kammern einspritzen konnte. Ein Rührstab aus Polyetheretherketon, der über ein elektromagnetisches Feld angetrieben wird, sorgte für eine stets konstante Durchmischung des Kammerinhalts mit 750U/min.

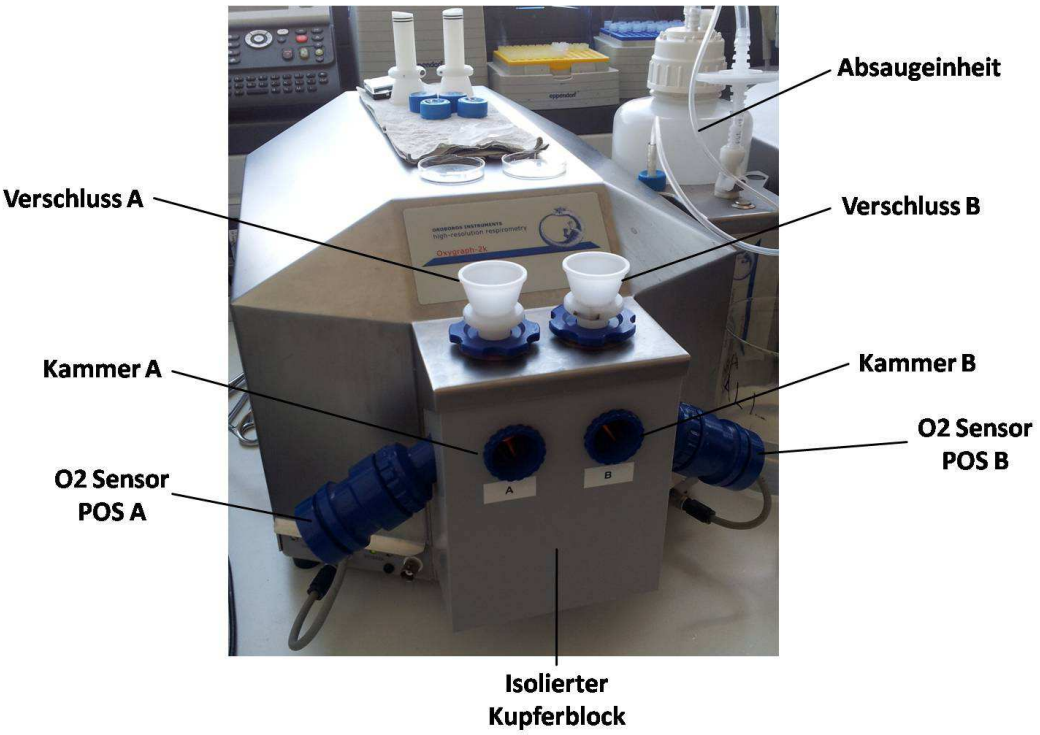


**Abbildung 3: „Oxygraph-2k" zur Messung der Atmungsaktivität. Zwei identische Kammern mit jeweils 2 unabhängigen 2ml Glaskammern (A und B) waren in einem isolierten Kupferblock untergebracht, der für eine konstante Temperatur sorgte. Die Sauerstoffkonzentration wurde über die Polarographischen Sauerstoff Sensoren (POS A/B) in jeder Kammer gemessen. Der Verschluss der Kammer enthielt eine Kapillare zum Entlüften und zur Titration. Der Polyetheretherketon-Rührstab wurde durch Magnete im Kupferblock elektromagnetische angetrieben.**

Der Oxygraph-2k wurde als Messinstrument gewählt, da das Messprinzip auf die beiden polarographischen Sauerstoffsensoren (POS) beruhte.

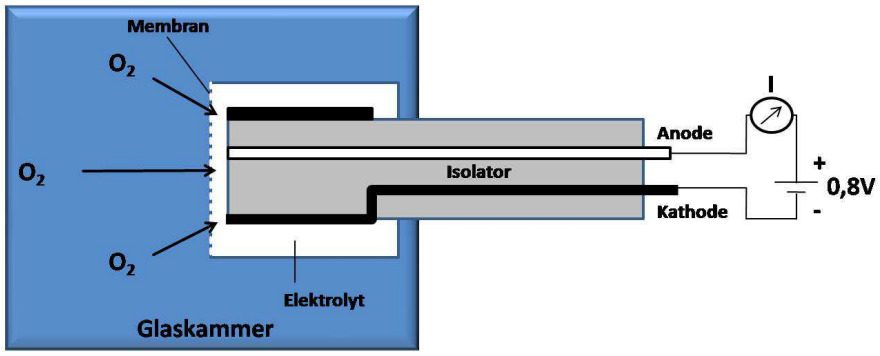


**Abbildung 4: Polarographischer Sauerstoffsensor („Clark Elektrode"). Durch eine Redoxreaktion am Sensor konnte durch den Stromfluss (I), bei Konstanter Spannung in Volt (V) direkt auf die Menge der verbrauchten Sauerstoffmoleküle (O2) geschlossen werden.**

Der berechnete Sauerstoffverbrauch ermöglichte einen Rückschluss auf die zelluläre Atmung. Dadurch wurde das Untersuchen der Wirkung verschiedener Substrate und Inhibitoren an der Atmungskette, sowie das Berechnen verschiedener Parameter der mitochondrialen Atmung möglich. Es konnten kleinste Veränderungen des zellulären Metabolismus aufgezeigt werden und Unterschiede zwischen exponierten Zellen und den dazugehörigen Kontrollen dokumentiert und verglichen werden. Der große Vorteil der Methode war die freie Wahl der verschiedenen Substrate und Inhibitoren sowie die beliebig wählbaren Versuchsprotokolle. Durch Oxidationsprozesse am Sensor kam es allerdings zu Sauerstoffverbrauch. Dieser musste durch ein Protokoll gesondert festgestellt werden und dann in die Korrektur der Messwerte einfließen. Ein alternatives System wäre der „XF-Analysator" von „Seahorse Biosience" gewesen. Dieser arbeitete mit einem optischen Sensor und führte deshalb nicht zu einem Sauerstoffverbrauch durch die Messmethode. Außerdem ermöglichte das System einen Vergleich vieler einzelner Kammern. Der große Nachteil war eine starke Einschränkung in der Flexibilität und im Umfang der Protokolle. Man konnte maximal 4 verschiedene Inhibitoren oder Substrate pro Kammer hinzugeben. Außerdem war die Messgenauigkeit durch Sauerstoffrückdiffusion, ungenaues Kammervolumen, Temperaturinstabilität und geringere Auflösung eingeschränkt. Damit waren Kopplungsanalysen und die Untersuchung einzelner Komplexe der Atmungskette nicht möglich.

Vor Versuchsbeginn erfolgte die Eichung der Clark-Elektroden durch Zweipunktkalibrierung. Diese erfolgt bei Raumluftsättigung und einer Sauerstoffkonzentration, die annähernd dem Nullwert entsprach. Dazu wurden eine Stunde vor Beginn der Messung beide Messkammern mit 2,1ml MiR05 gefüllt. Durch MiR05 wurden die nötigen Bedingungen für die Messung der zellulären Atmung geschaffen. Es enthielt den Metallchelator EGTA zum Abfangen von $Ca^{2+}$-Ionen, einen Magnesiumdonor zur Stabilisierung der ATP-Moleküle, einen $K^{+}$-Donor um die intrazellulär hohen Kaliumkonzentrationen einzustellen, die Membranstabilisatoren Taurin und BSA, HEPES als Puffersubstanz und einen Phosphatlieferant. Der Löslichkeitsfaktor von Sauerstoff in MiR05 betrug 0,92. [43]

**Tabelle 3: Zusammensetzung von 1000ml MiR05-Pufferlösung (Osmolarität 330mosm/L). Die Lösung enthielt Ethylene Glycol tetraacetic acid (EGTA), Magnesiumchlorid, Kalium-Lactobionat, Kaliumhydrogenphosphat, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES), Saccharose und Bovine Serum Albumine (BSA).**

| | |
|---|---|
| EGTA | 190 mg |
| BSA, fettsäurefrei | 1000 mg |
| HEPES | 4770 mg |
| Kaliumdihydrogenphosphat | 1361 mg |
| Kalium-Lactobionat | 120 ml einer 0.5 M Lösung |
| Magnesiumchlorid | 610 mg |
| Saccharose | 37650 mg |
| Taurin | 2502 mg |

Die Temperatur wurde auf 37°C eingestellt, die Magnetrührer mit 750U/min gestartet und das Aufzeichnungsintervall für die Daten auf 0,5Hz gestellt. Die Kammern wurden mit Hilfe eines Platzhalters nicht ganz geschlossen sodass sich die Sauerstoffkonzentration in den Kammern der Raumluft angleichen konnte. Nach etwa einer Stunde stellt sich eine konstante Sauerstoffkonzentration ein. Der Sauerstoffffluss zu dem Zeitpunkt der Kalibrierung betrug dann 0pmol/(s x mg). Über die Software Datalab 4 erfolgte damit eine Eichung der Clark-Elektroden und die Skalierung der Graphen. Nach Abschluss wurde das Kammervolumen MiR05 wieder aus den beiden Glaskammern abgesaugt. Damit war das Gerät einsatzbereit und die Kammern konnten mit Zellen gefüllt werden.

### 2.2.4 Versuchsdurchführung

Für die Durchführung der Experimente wurden die Alveolarmakrophagen in je eine Kontrollgruppe ohne Hyperoxie und eine Expositionsgruppe mit 24h Hyperoxie eingeteilt. Untersucht wurden die Hyperoxiegruppen und ihre Kontrollen nach drei verschiedenen Versuchsprotokollen.

Das Protokoll „Standard“ wurde entwickelt um klassische Respirationsstadien der Atmungskette an intakten Zellen zu untersuchen und zu vergleichen. Die zugrundeliegenden Experimente zur Beeinflussung von mitochondrialer Bioenergetik wurden von Chance und Williams beschrieben. [18] Mit den beiden Complex-Protokollen wurden dann die einzelnen Elemente der Atmungskette (Komplexe) getrennt voneinander untersucht. Dazu wurde die Zelle permeabilisiert. So sollten zum einen die einzelnen Komplexe der Atmungskette gezielt untersucht werden und zum anderen der Vergleich zwischen gekoppelter Atmung im Protokoll „Complex-entkoppelt“ und entkoppelter Atmungskette im Protokoll „Complex–ADP“ möglich werden. Von Kopplung spricht man, wenn das Elektronen-Transport-System (ETS) der Atmungskette an die ATP-Synthase (Komplex V) gebunden ist und der aufgebaute Protonengradient zur ATP-Synthese verwendet wird. [36] Durch Entkoppler wie Thermogenin oder Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) war eine Unterbrechung dieser Kopplung von Elektronentransport an ATP-Synthese möglich. Durch die Entkoppler wurde der entstehende Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran unter Umgehung der ATP-Synthase abgebaut und damit kam die ATP-Synthese zum Erliegen.

Für jedes Protokoll wurde je eine Zellkulturflasche mit Alveolarmakrophagen für 24h in einer Atmosphäre von 95% $O_2$ und 5% $CO_2$ bei 37°C wie oben beschrieben inkubiert und mit Hyperoxie bezeichnet. Eine zweite Flasche wurde für dieselbe Zeit in einem Inkubator 37°C in einer Normalatmosphäre mit 21% $O_2$ und 5% $CO_2$ kultiviert. Dann wurde verblindet entweder die Zellkulturflasche der Hyperoxiereihe aus der Expositionskammer oder die Kulturflasche der Kontrollreihe aus dem Inkubator vorbereitet und nach dem jeweiligen Messprotokoll untersucht. Die hier in den Messprotokollen angegebenen Substratmengen waren immer so hoch gewählt, dass eine Hemmung der mitochondrialen Atmung durch Substratmangel ausgeschlossen werden konnte. Dadurch war eine gute Quantifizierung der Leistungsfähigkeit der Mitochondrien möglich. [29]

### *2.2.4.1 Aufarbeitung der Zellen*

Die Zellen wurden mit einem Spatel vom Boden der Flasche gelöst und in Suspension gebracht. Dann wurde mit einer Pipette die Lösung in ein Falcon-Röhrchen gegeben und drei Minuten bei 800U/min und 37°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen mit 10 ml der Puffersubstanz DPBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das nach Abgießen des Überstands gewonnene Pellet wurde dann mit 10 ml MiR05 gewaschen und jeweils 2 ml in die Kammern des Oxygraph-2k gegeben. Aus jeder Kammer wurden 10µl zur Bestimmung der Zellzahl entnommen.

Vor dem Verschließen der Kammer wurden stets 10µl; 5mM Natrium-Pyruvat hinzugefügt. Zum einen lag somit genügend Substrat vor, um eine Hemmung der Basisrespiration durch Substratmangel auszuschließen und zum anderen wirkte das Natrium-Pyruvat als Antioxidans. Es band freie Radikale und wirkte damit als Zellstabilisator. Die Kammern wurden dann verschlossen und bis zum Erreichen einer konstanten Basisrespiration wurden die Zellen mit Hilfe eines Hemozytometers gezählt. Dazu wurden je 10µl Zellsuspension beider Kammern mit je 20µl Trypanblau angefärbt und homogenisiert. 20µl der Lösung wurden dann auf die Zählkammer des Hemozytometers gegeben und mit einem Deckglas versehen. Die Zellen, die unter dem Mikroskop ein hellblaues Zytoplasma zeigten, wurden als lebende Zellen gezählt, während die Zellen mit dunkelblauer Färbung als tot angenommen wurden. [101]

Die ermittelte Zahl in Millionen/ml wurde in die Software eingegeben um die Berechnung des Sauerstoffverbrauachs auf die Zellzahl umzurechnen. Die Anzahl der gezählten Zellen bewegte sich während den Versuchen konstant zwischen 1 bis 1,5Millionen pro Kammer.

### *2.2.4.2 Protokoll „Standard“*

Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll hinsichtlich verschiedener klassischer Atmungszustände bei 37°C untersucht. Dabei sollte ein Eindruck über die Funktion der Komplexe der Atmungskette als gesamte Einheit entstehen, während in einem anderen Protokoll die Komplexe einzeln betrachtet wurden. Durch Einsatz von Substraten, die gezielt an bestimmten Komplexen der Atmungskette zum Elektronentransport führten, sowied durch verschiedene Atmungsketteninhibitoren wurden vier Atmungsstufen nach einer Publikation von Chance und Williams untersucht: Stadium R, L, E und ROX. [18]

**Tabelle 4: Gezeigt ist die Reihenfolge und Menge der Substrate und Inhibitoren mit dem korrespondierenden Atmungsstadium im Protokoll „Standard“ bei intakter Zelle. FCCP steht für Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon und ROX für Residual Oxygen Consumption.**

| Protokoll: Standard 37°C | |
|---|---|
| Wirkstoff | Atmungsstadium |
| 1. Pyruvat 10µl; 5mM | Routineatmung (R) |
| 2. Oligomycin 1µl; 2,5µM | Kompensationsstadium (L) |
| 3. FCCP 1µl; 0,5µM | Entkopplungsstadium (E) |
| 4. Rotenon 5 µl; 0,5 µM | Residual Oxygen Consumption (ROX) |
| 5. Antimycin A 2µl; 5µM | |

**Physiologische Routineatmung R:**

Nach dem Schließen der Messkammern und Titration von 10µl; 5mM Pyruvat war ein 5 bis 10 minütiges Intervall zur Signalstabilisation nötig. Zu Beginn wurde in jedem Messprotokoll zunächst die aerobe metabolische Aktivität einer physiologischen Routine-Atmung ermittelt. Bei dieser Routineatmung (Stadium R) ist das Elektronen Transfer System (ETS) der Atmungskette an die ATP-Synthase gekoppelt. [40] Dabei lag die Konzentration von ATP deutlich über der von ADP. Der gemessene Sauerstoffverbrauch zum Zeitpunkt der physiologischen Routineatmung diente vor allem der Aufrechterhaltung des Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran. Er beinhaltete allerdings auch einen Elektronenfluss zur Produktion von Wärme. [9, 77]

Eine gesteigerte Routineatmung konnte andererseits auch Ausdruck einer Kompensationsatmung sein. Zur Kompensationsatmung kam es bei Integritätsverlust der Zellen, Entkopplung der Atmungskette oder anderen Zellschäden. Eine gesteigerte Routineatmung konnte also ein sensitiver Parameter für zellschädigende Einflüsse einer Hyperoxie sein. Um den basalen Sauerstoffverbrauch zu messen, wurde zu den Zellen Pyruvat als Substrat hinzugefügt. Die gemessenen Werte wurden nach der ermittelten ROX korrigiert und verglichen.

**Kompensationsstadium L:**

Nach dem Erreichen des Stadiums R wurde 1µl; 2,5µM Oligomycin in die Glaskammern titriert. Dadurch wurde die ATP-Synthase an ihrem F0-Teil gehemmt. Damit kam die Oxidative Phosphorylierung zum Erliegen. Da nun durch den aufgebauten Protonengradienten keine ADP-Phosphorylierung mehr stattfinden konnte war der gemessene Sauerstoffverbrauch mit einer Leckageatmung (L) gleichzusetzen. [44] Das Stadium L gab also den Ruhezustand der entkoppelten Atmungskette an und deckte einen Verbrauch von Sauerstoff ohne Aktivität der ATP-Synthase auf. Dieser Sauerstoffverbrauch war durch Schäden an der inneren Mitochondrienmembran (IMM), eine Protonen- oder Elektronenleckage durch die Bildung von ROS, einen Kationenshift über die innere Mitochondrienmembran ($Ca^{2+}$ oder $K^{+}$) oder durch residualen Sauerstoffkonsum zu erklären. [40] Die gemessenen Werte wurden nach der ermittelten ROX korrigiert und verglichen.

**Entkopplungsstadium E:**

Nach dem Ermitteln der Leckage wurde das Elektronentransportsystem entkoppelt, um die maximale Kapazität zu ermitteln. Als Entkoppler wurde der hydrophobe Protonenionophor FCCP eingesetzt. Die Titration mit 0,5µM FCCP erfolgte in 1µl Schritten, bis keine Steigerung der zellulären Atmung mehr erreicht werden konnte. Der Protonencarrier löste die Verknüpfung des Elektronentransportsystems mit der oxidativen Phosphorylierung, indem sich FCCP in die innere Mitochondrienmembran einlagerte und den Rücktransport von Protonen in die Matrix ermöglichte.

Um den Protonengradienten dennoch aufrecht zu erhalten, arbeitete die Atmungskette mit höchster Geschwindigkeit. Dadurch wurde ein unphysiologischer Zustand geschaffen. Durch die Entkopplung konnte die maximale Kapazität der Atmungskette bestimmt werden, ohne dass dabei eine Hemmung durch die ATP-Synthase eintritt. [44] Wobei zu beachten war, dass eine übermäßige Verwendung von FCCP die Atmungskette paradox hemmen konnte. [99]
Die maximale Kapazität im entkoppelten Zustand als Referenzwert konnte herangezogen werden um andere Werte zu normieren, in Prozent anzugeben und vergleichen zu können. [40]

**ROX:**

Am Schluss wurden 5µl; 0,5µM Rotenon und 2µl; 5µM Antimycin A hinzugegeben und so die Komplexe I und III ausgeschaltet. Der zu diesem Zeitpunkt gemessene Wert gab die Residual Oxygen Consumption (ROX) an. Die mitochondriale Atmungskette war ausgeschaltet und die Abweichung von der Nulllinie war damit der Soft- bzw. Hardware zuzuschreiben oder wurde beispielsweise durch eine Peroxidaseaktivität oder die Bildung von ROS verursacht. [40] Die Entkopplung der Atmungskette durch FCCP vor der Gabe von Rotenon und Antimycin A verhinderte eine gesteigerte Bildung von ROS unter Rotenon- und Antimycin A-Einfluss. [9] Die gemessenen Werte anderer Stadien wurden jeweils nach ROX korrigiert um keine falsch hohen Werte zu erhalten. [44]

### *2.2.4.3 Kontrollen*

Um festgestellte Veränderungen zwischen der Hyperoxiereihe und ihren Kontrollen zu validieren, mussten in zwei zusätzlichen Kontrollen zwei bekannte Fehlerquellen ausgeschlossen werden:

**Kontrolle bei 25°C:**

Bei der ersten Kontrolle mit 25°C wurde nach dem Protokoll „Standard“ vorgegangen. Dabei wurde der Oxygraph-2k aber aber auf 25°C statt auf 37°C eingestellt. Das Protokoll bei 25°C wurde durchgeführt um eine zufällige Beeinflussung durch temperaturbedingte Instabilität der Zelle auszuschließen. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Arbeitsgeschwindigkeit und Kapazität der Atmungskette bei 25°C um 50% gesenkt wurde. Dadurch konnte eine bessere Stabilität der Zellen erreicht werden. [11, 28]

**Kontrolle ohne Oligomycingabe:**

Bei der zweiten Kontrolle ohne Oligomycin wurde ebenso nach dem Protokoll „Standard“ vorgegangen. Allerdings wurde auf die Gabe von Oligomycin zu Beginn verzichtet. Es ist bekannt, dass es unter Oligomycin zu einem entkoppelten Fluss aufgrund von Hemmung der Phosphorylierung kommen kann. [39] Deshalb musste durch die Kontrollreihe ohne Oligomycin ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Respirationsminderung bei der Hyperoxiereihe durch Oligomycin bedingt war.

### *2.2.4.4 Protokoll „Complex–entkoppelt“*

Nachdem im Protokoll „Standard“ die Atmungskette als Gesamteinheit untersucht wurde, wurde das Protokoll „Complex-entkoppelt“ entwickelt um an der permeabilisierten Zelle die verschiedenen Komplexe der Atmungskette isoliert voneinander zu untersuchen. Dazu wurde die Zelle permeabilisiert um so eine Entkopplung der Atmungskette von der oxidativen Phosphorylierung zu erreichen. Nur dann hat man die Möglichkeit die einzelnen Komplexe gesondert zu betrachten. Es wurden dann, neben den Stadien R, L und E auch die Komplexe I, II und IV auf ihren Metabolismus untersucht.

**Tabelle 5: Gezeigt ist die Reihenfolge und Menge der Substrate und Inhibitoren mit dem korrespondierenden Atmungsstadium im Protokoll „Complex-entkoppelt“ in permeabilisiertem Zustand. FCCP steht für Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon und ROX für Residual Oxygen Consumption.**

| **Protokoll Complex (entkoppelt)** | |
|---|---|
| Wirkstoff | Atmungsstadium |
| 1. Pyruvat 10µl; 5mM | Routineatmung (R) |
| 2. Oligomycin 1µl; 2,5µM | Kompensationsstadium (L) |
| 3. FCCP 1µl; 0,5µM | Entkopplungsstadium (E) |
| 4. Saponin 6µl | Permeabilisierung |
| 5. Malat 12,5µl 5mM+Glutamat 10µl; 10mM | Komplex I |
| 6. Cytochrom C 5µl; 10µM | Cytochrom C Test |
| 7. Rotenon 5 µl; 0,5 µM | Hemmung Komplex I |
| 8. Succinat 20µl; 10mM | Komplex II |
| 9. Antimycin A 2µl; 5µM | ROX |
| 10. Ascorbat 5µl; 2mM | Komplex IV |
| 11. Tetramethylphenylendiamin 5µl, 0,5mM | |
| 12. Natriumsulfat 50µl, 50µM | |

**Stadium R, L und E:**

Nach Signalstabilisation wurde zunächst wieder die physiologische Routineatmung R bestimmt. Dann wurde nach der Zugabe von 1µl; 2,5µM Oligomycin das Kompensationsstadium L gemessen, bis schließlich nach Titration von 0,5µM in 1µl Schritten das Entkopplungsstadium E abgelesen werden konnte.

**Permeabilisierung:**

Um die Möglichkeit zu haben die Komplexe der Atmungskette einzeln untersuchen zu können war es notwendig die Zellen zu permeabilisieren. Dafür wurden 5ml–10ml Saponin in die Kammern titriert. Als mildes Detergens löste es die Zellmembran wegen ihres hohen Cholesteringehalts schon bei niedrigen Konzentrationen auf, während die Mitochondrienmembranen intakt blieben. [38] Als Zeichen einer ausreichenden Permeabilisierung wurde der Abfall des Sauerstoffverbrauchs der Zellen gewertet. So kam es durch den Integritätsverlust der Zellkompartimente zum Substratverlust und damit zur Hemmung der Atmungskettenaktivität durch Substratmangel. Durch die Gabe selektiver Substrate und Inhibitoren konnte man danach die einzelnen Komplexe isoliert voneinander untersuchen. Durch Überdosierung der Detergenzien kann es allerdings auch zum Integritätsverlust der äußeren Mitochondrien kommen. Deshalb sollte frühzeitig im Protokoll Cytochrom C gegeben werden, um eine Verfälschung der Werte durch fehlendes Cytochrom C zu verhindern. [70]

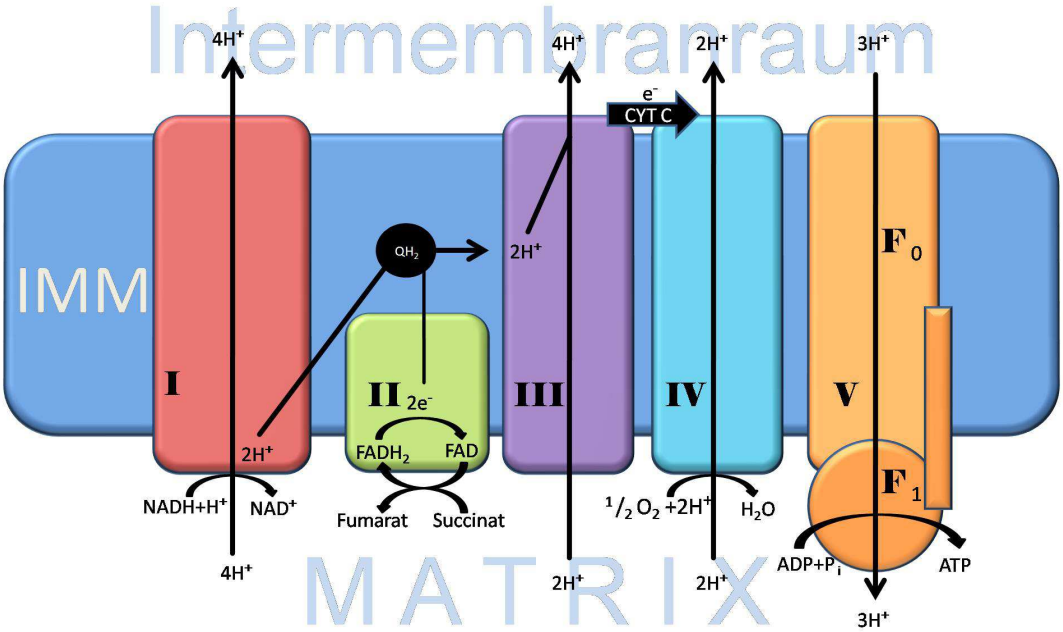


**Abbildung 5: Darstellung der einzelnen Komplexe der Atmungskette. In der inneren Mitochondrienmembran (IMM) liegen Komplex I (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Dehydrogenase), Komplex II (Succinat-Dehydrogenase), Komplex III (Cytochrom C Reduktase), Komplex IV (Cytochrom C Oxidase) und Komplex V (ATP-Synthase) mit $F_0$- und $F_1$-Teil. Für den Elektronentransport zu Komplex III ist das Ubichinon (Q)/Ubichinol ($QH_2$) verantwortlich, für die Weiterleitung der Elektronen von Komplex III auf Komplex IV das Membranprotein Cytochrom C (Cyt C).**

**Komplex I (NADH-Dehydrogenase):**

Für die Untersuchung der NADH-Dehydrogenase wurden 12,5µl; 5mM Malat und 10µl, 10mM Glutamat hinzugegeben. Das erreichte Plateau zeigte nun den Sauerstoffverbrauch durch Komplex I an.

**Cytochrom C Test:**

Als nächstes wurde 5 µl; 10 µM Cytochrom C gegeben um die Intaktheit der äußeren Mitochondrienmembran zu testen. Der Cytochrom C Test wurde verwendet, als sensitives Verfahren zum Nachweis von Schäden an der äußeren Mitochondrienmembran. Durch Kanäle oder Poren bzw. durch einen Integritätsverlust der äußeren Mitochondrienmembran konnte es zum Verlust von Cytochrom C kommen. [107] Wurde Cytochrom C freigesetzt konnte es nicht mehr als Elektronentransportprotein fungieren. Sprach eine Zellkultur also mit ihrer Aktivität auf eine Gabe von Cytochrom C an, so war dies ein indirekter Hinweis auf Verletzungen der äußeren Mitochondrienmembran. Deshalb wurde die Integrität der Membran durch die Zugabe von Cytochrom C überprüft. [45] Trotz Schäden an der äußeren Mitochondrienmembran blieb die innere Mitochondrienmembran in der Regel erhalten. Damit blieben das Elektronentransportsystem und die ATP-Synthese unbeeinflusst. [42, 93]. So konnte Von Ahsen in vitro eine intakte Polarisation der inneren Mitochondrienmembran nach kompletter Cytochrom C Depletion nachweisen. [106]. In vivo würde eine Cytochrom C Freisetzung allerdings wie beschrieben zu einer Aktivierung der Kaspasen und damit zur Apoptose führen. [65, 80] Da es unter der Verwendung von Saponin ebenfalls zu einem Schaden an der äußeren Mitochondrienmembran kommen konnte, sollte frühzeitig im Protokoll Cytochrom C gegeben werden um keine falsch niedrigen Werte durch fehlendes Cytochrom C zu erhalten.

**Komplex II (Succinat-Dehydrogenase):**

Durch die Gabe von 5µl; 0,5µM Rotenon wurde nun Komplex I gehemmt. Damit war es nach der Gabe von 20µl; 0,5mM Succinat möglich die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase zu untersuchen, da der Sauerstoffverbrauch nach Hemmung des Komplex I durch die Aktivität von Komplex II bedingt wurde.

**ROX:**

Am Schluss wurde 2µl; 5µM Antimycin A hinzugegeben und so Komplex III ausgeschaltet. Der zu diesem Zeitpunkt gemessene Wert gab die Residual Oxygen Consumption (ROX) an.

**Komplex IV (Cytochrom C Oxidase):**

Um die Funktion der Cytochrom C Oxidase (Komplex IV) zu quantifizieren wurde Tetramethylphenylendiamin (TMPD) verwendet. Es handelte sich um einen Redoxindikator für Komplex IV der zur Bestimmung der Cytochrom C Oxidase Aktivität verwendet wurde. Er diente als Substrat zur Reduktion von Cytochrom C. Da TMPD selbst autooxidiert wurde war eine Gabe von Ascorbat als Antioxidans notwendig. Es führte zu Reduktion des autooxidierten TMPD. Die Redoxreaktion zeigte sich durch ein stetig abfallendes Schrägplateau, das die Funktion der Cytochrom C Oxidase darstellte.

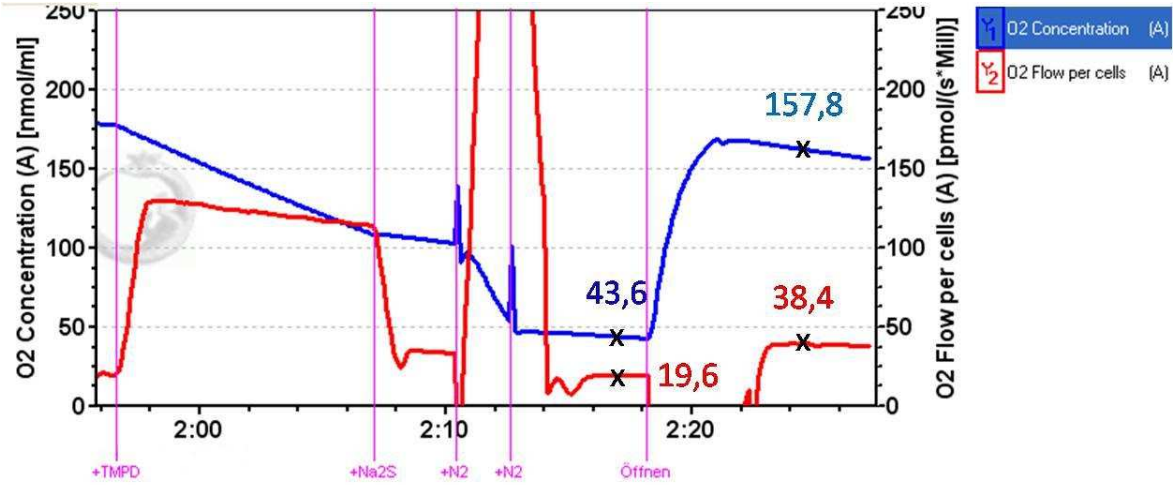


**Abbildung 6: Dargestellt ist das Schaubild zur Ermittlung der Aktivität von Komplex IV mit Titration von Tetramethylphenylendiamin (TMPD) und Natriumsulfat (Na2S), sowie die Gabe von Stickstoff (N2) und das Öffnen der Kammer zur Reoxigenierung. Die Punkte zum Erstellen einer Eichgeraden wurden bei zwei unterschiedlichen Sauestoffkonzentrationen markiert. Auf der linken Ordinate ist die Sauerstoffkonzentration in Nanomol pro Milliliter (nmol/ml) aufgetragen (blaue Linie). Auf der rechten Ordinate ist der Sauerstoffverbrauch in Picomol pro Sekunde und Milligramm (pmol/s*mg) aufgetragen (rote Linie). Auf der Abszisse werden die Substrate und Inhibitoren über die Zeit (in Stunden) Protokolliert.**

Da der autooxidativ bedingte Sauerstoffverbrauch vom Sauerstoffverbrauch durch die Cytochrom C Oxidase abgezogen werden musste, wurde schließlich der Komplex IV durch $Na_2S$ gehemmt. Dadurch erhielt man einen Wert für das Maß der Autooxidation von TMPD. Da diese auch von der jeweiligen Sauerstoffkonzertration der Lösung abhängig war, wurden zwei Messpunkte bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen benötigt. Zuerst wurde gasförmiger Stickstoff in die Messkammern geleitet um die Sauerstoffkonzentration durch erhöhten Stickstoffanteil in der Lösung zu erniedrigen. Dann wurde die Kammer schließlich für eine Reoxigenierung geöffnet um eine erhöhte Sauerstoffkonzentration zu erhalten.

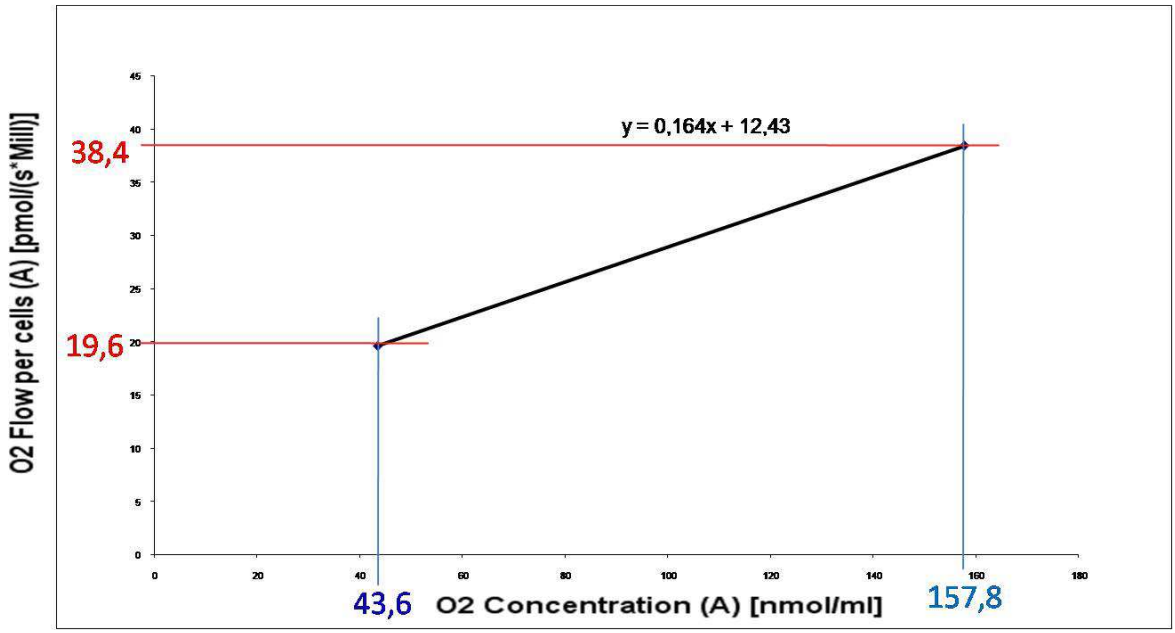


**Abbildung 7: Dargestellt ist eine Eichgerade zur Eichung der metabolischen Aktivität von Komplex IV. Dabei wurden zwei Flow-Messpunkte bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen aufgetragen (siehe auch Abbildung 6). Auf der Ordinate befindet sich der Sauerstoffffluss pro Zelle in pmol/(s*Mill) (rot) und auf der Abszisse die Sauerstoffkonzentration in nmol/ml (blau).**

Die beiden Messpunkte ermöglichten das Erstellen einer Eichgeraden und damit das Ermitteln der Autooxidation von TMPD, bei der jeweilig herrschenden Sauerstoffkonzentration. Die ermittelten Werte für die Aktivität der Cytochrom C Oxidase wurden nach der Normierung mit Hilfe der Eichgeraden verglichen.

### *2.2.4.5 Protokoll „Complex–ADP“*

Nachdem die Atmungskette zuvor in entkoppeltem Zustand untersucht wurde, wählten wir das Protokoll „Complex-ADP“, um die einzelnen Elemente der Atmungskette in gekoppeltem Zustand zu untersuchen. Hier wurden die Komplexe I, II und IV in ihrer Funktionsfähigkeit mit und ohne Hyperoxie getestet. Dafür wurde die Zelle ebenfalls permeabilisiert.

**Tabelle 6: Gezeigt ist die Reihenfolge und Menge der Substrate und Inhibitoren mit dem korrespondierenden Atmungsstadium im Protokoll „Complex-ADP“ in gekoppeltem Zustand. ADP steht für Adenosindiphosphat und ROX für Residual Oxygen Consumption.**

| Protokoll Complex (ADP) | |
|---|---|
| Wirkstoff | Atmungsstadium |
| 1. Pyruvat 10µl; 5mM | Routineatmung (R) |
| 2. Digitonin 3µl; 1,62µM | Kompensationsstadium (L) |
| 3. Malat 12,5µl 5mM+Glutamat 10µl; 10mM | Komplex I |
| 4. Cytochrom C 5µl; 10µM | Cytochrom C Test |
| 5. Adenosindiphosphat 20µl; 5mM | Stadium 3 |
| 6. Succinat 20µl; 10mM | Komplex I+II |
| 7. Rotenon 5 µl; 0,5 µM | Komplex II |
| 8. Antimycin A 2µl; 5µM | ROX |
| 9. Ascorbat 5µl; 2mM | Komplex IV |
| 10. Tertamethylphenylendiamin 5µl, 0,5mM | |
| 11. Natriumsulfat 50µl, 50µM | |

**Physiologische Routineatmung R:**

Auch hier wurde zunächst nach dem 5-10 minütigen Intervall zur Signalstabilisation die Routineatmung bestimmt.

**Kompensationsstadium L:**

Um die Komplexe der Atmungskette einzeln untersuchen zu können war es auch hier notwendig die Zellen zu permeabilisieren. Dafür wurde 3µl; 1,62µM Digitonin gewählt. Vergleichbar zu Saponin wirkte auch Digitonin als mildes Detergens und löste ebenfalls die Zellmembran schon bei niedrigen Konzentrationen, während die Mitochondrienmembran intakt blieb.

**Komplex I (NADH-Dehydrogenase):**

Für die Untersuchung der NADH-Dehydrogenase wurden 12,5µl; 5mM Malat und 10µl, 10mM Glutamat hinzugegeben. Das erreichte Plateau zeigte nun isoliert den Sauerstoffverbrauch durch Komplex I an.

**Cytochrom C Test:**

Als nächstes wurde 5 µl; 10 µM Cytochrom C hinzu gegeben um die Intaktheit der äußeren Mitochondrienmembran zu testen.

**Stadium 3:**

Durch die Gabe von 20µl; 5mM ADP wurde das sogenannte Stadium 3 erreicht. Es stellte die Kapazität der oxidativen Phosphorylierung (Oxphos Kapazität) bei gekoppelter Atmungskette unter dem Einfluss normobarer Hyperoxie da, dabei wurde die ATP-Synthase durch ADP maximal stimuliert. Der als Stadium 3 bezeichnete Atmungszustand war erreicht, als die benötigten Substrate und ADP im Überschuss vorlagen. [41] Das ermöglichte einen ungehinderten Ablauf des Citratzyklus und verhinderte die Hemmung durch Mangel an Metaboliten. [36]

**Komplexe I+II:**

Durch die Gabe von 20µl; 0,5mM Succinat konnte die gleichzeitige Aktivität der NADH-Dehydrogenase und der Succinat-Dehydrogenase analysiert werden. Wegen kompetitiver Effekte war die gleichzeitig gemessene Aktivität (I+II) stets geringer als die Aktivität der einzelnen Komplexe.

**Komplex II (Succinat-Dehydrogenase):**

Durch die Gabe von 5µl; 0,5µM Rotenon wurde nun Komplex I gehemmt. Damit war es möglich die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase isoliert zu analysieren, da der Sauerstoffverbrauch nach Hemmung des Komplex I nur durch die Aktivität von Komplex II bedingt wurde.

**ROX:**

Zum Schluss wurde 2µl; 5µM Antimycin A hinzugegeben und so der Komplex III ausgeschaltet. Der zu diesem Zeitpunkt gemessene Wert gibt die Residual Oxygen Consumption (ROX) an.

**Komplex IV:**

Um die Funktion der Cytochrom C Oxidase (Komplex IV) zu quantifizieren wurde 5 µl; 0,5 mM Tetramethylphenylendiamin (TMPD), 5µl; 2mM Ascorbat und 50 µl; 50 µM $Na_2S$ hinzugegeben. Durch die Gabe von Stickstoff und das Öffnen der Kammer wurde dann wie in den Abbildung 6 und 7 beschrieben die Eichgerade erstellt.

**Ermittlung des Kopplungsgrades (P/E-Ratio):**

Schließlich sollte durch die Arbeit untersucht werden ob eine normobare Hyperoxie Einfluss auf die Kopplung der Atmungskette hat. Dazu wurde die Phosphorylation Control Ratio (P/E-Ratio) berechnet. Sie gibt an, inwieweit die Kapazität der Atmungskette durch das Phosphorylierungssystem der ATP-Synthase gehemmt wird bzw. welchen Anteil (relative Atemaktivität) der gesamten Elektronen-transportkapazität (Stadium E) die oxidative Phosphorylierung (Stadium P) ausschöpft. [36] In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg der P/E-Ratio durch Schäden am Phosphorylierungssystem kommen kann, was sich konsekutiv durch eine Abnahme des Kopplungsgrades zeigen würde. [41]

### 2.2.6 Statistik

Zur Auswertung und im Rahmen der deskriptiven Statistik wurde die Software SPSS Statistics verwendet.

Bei den kleinen Fallzahlen war keine Normalverteilung gegeben. Deswegen wurde für die statistische Analyse ein nicht-parametrischer Test gewählt. Mit dem Rangsummentest nach Mann und Whitney wurde überprüft, ob sich die Ergebnisse signifikant unterscheiden. Signifikanz wurde dabei bei einem p–Wert $<0,05$ angenommen.

# 3. Ergebnisse

## *3.1 Protokoll „Standard“*

### 3.1.1 Messprotokoll bei 37°C

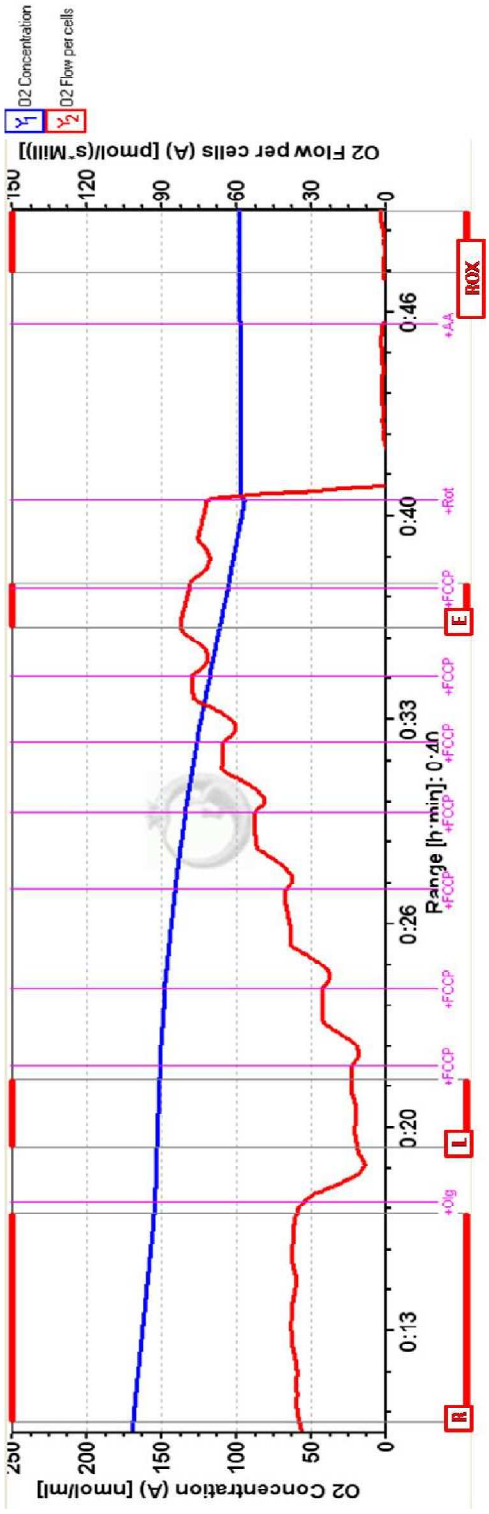


**Abbildung 8: Messprotokoll „Standard“ der Kontrollgruppe bei 37°C mit „Oxygraph-2k“. Auf der linken Ordinate ist die Sauerstoffkonzentration in Nanomol pro Milliliter (nmol/ml) aufgetragen (blaue Linie). Auf der rechten Ordinate ist der Sauerstoffverbrauch in Picomol pro Sekunde und Milligramm (pmol/s*mg) dargestellt (rote Linie). Auf der Abszisse sind die Substrate und Inhibitoren über die Zeit (in Stunden) protokolliert. Nach der Gabe von Pyruvat vor Messbeginn wurde die Routineatmung (R) erreicht. Nach Gabe von Oligomycin (Olg) wurde das Kompensationsstadium (L) ermittelt, bevor durch Zugabe von Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) das Entkopplungsstadium (E) abgelesen wurde. Am Schluss wurde nach Zugabe von Rotenon (Rot) und Antimycin A (AA) die Residual Oxygen Consumption (ROX) ermittelt.**

### 3.1.2 Messergebnis

Die ermittelten Werte der Stadien R, L und E wurden nach der ermittelten ROX korrigiert und verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied der Stadien R (p=0,62) und L (p=0,165) im Vergleich der Hyperoxiegruppe mit der Kontrolle gefunden werden. Jedoch wurde ein signifikanter Unterschied im Stadium E gefunden (p=0,002).

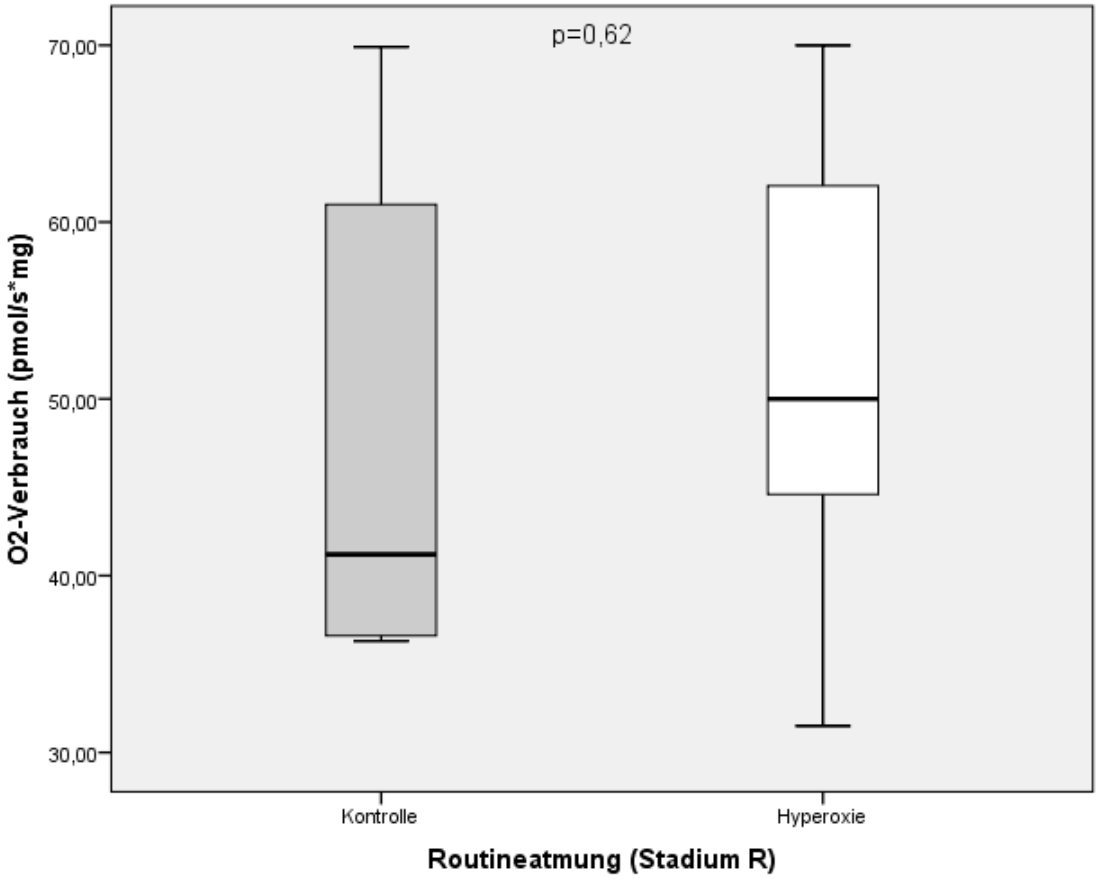


**Abbildung 9: Vergleich der Routineatmung (Stadium R) der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Standard“ bei 37°C mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=7) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=7), bei Erreichen eines Plateaus nach Pyruvatgabe zu Messbeginn. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Die Ergebnisse unterscheiden sich hier nicht signifikant (p=0,62).**

Im Stadium L konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (p=0,165). Es konnten also durch die Methode keine Schäden an der inneren Mitochondrienmembran durch normobare Hyperoxie nachgewiesen werden. Das Ergebnis war in den anderen Protokollen reproduzierbar.

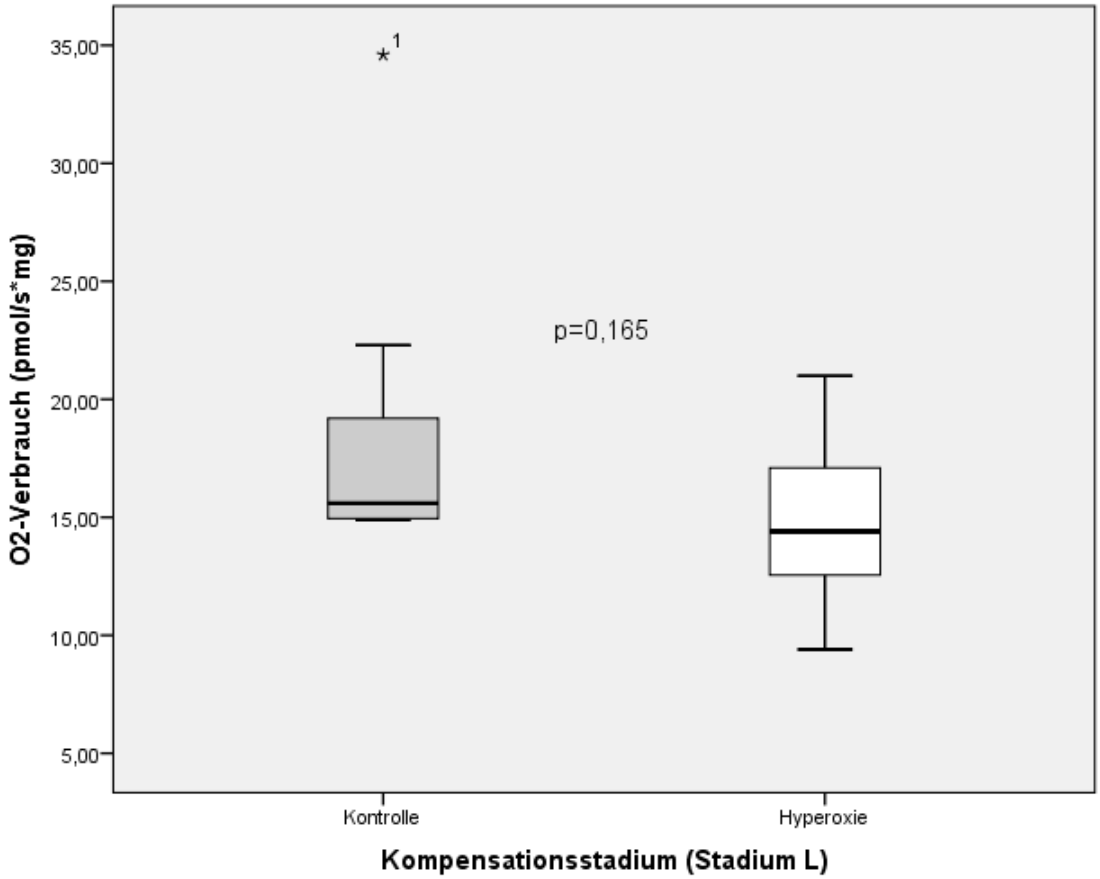


**Abbildung 10: Vergleich des Kompensationsstadiums (Stadium L) der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Standard“ bei 37°C mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=7) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=7), bei Erreichen eines Plateaus nach Oligomycingabe. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. *1= Extremwert. Die Ergebnisse unterscheiden sich hier nicht signifikant (p=0,165).**

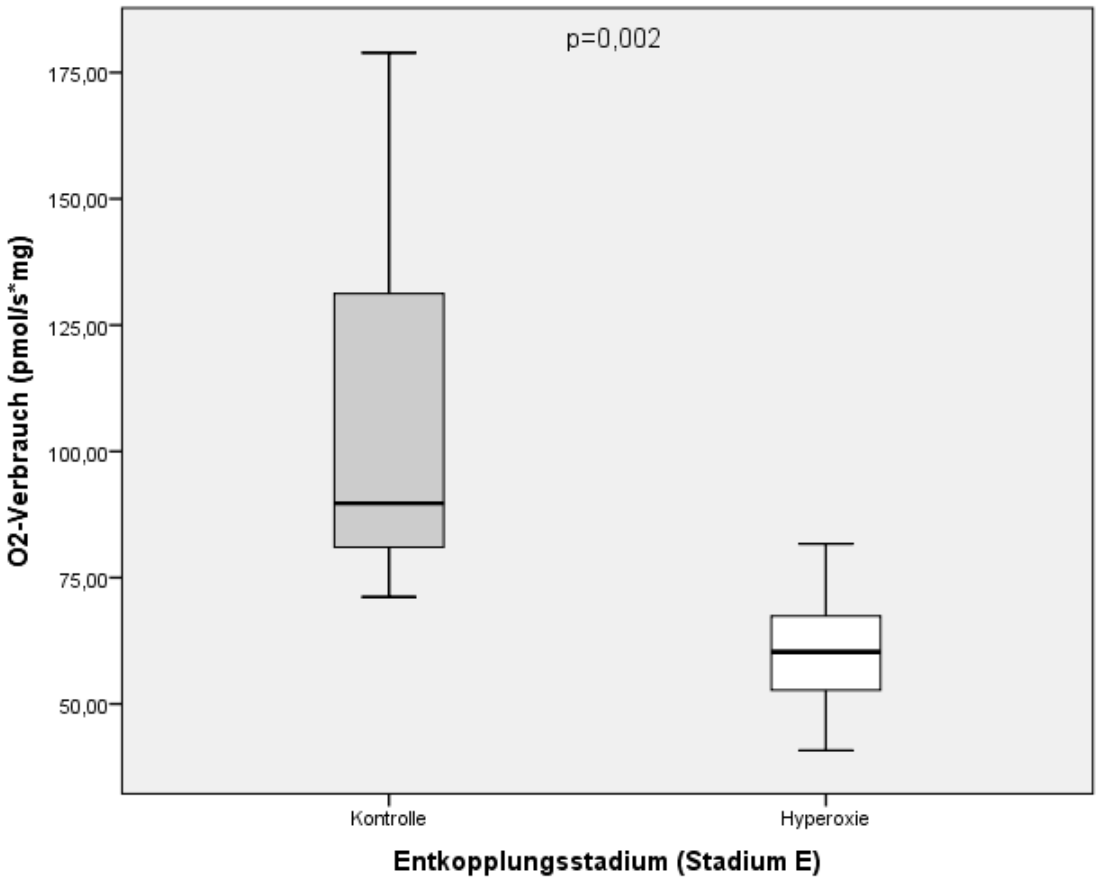


**Abbildung 11: Vergleich des Entkopplungsstadiums (Stadium E) der Alveolarmakrophagen mit „Oxygraph-2k“ im Protokoll „Standard“ bei 37°C mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=7) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=7), bei Erreichen eines Plateaus nach Gabe von Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP). Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Die Ergebnisse unterscheiden sich signifikant mit p=0,002.**

## *3.2. Hyperoxie ohne Oligomycin*

Das Messprotokoll ohne Einsatz von Oligomycin wurde erstellt um auszuschließen, dass die beobachtete Respirationsminderung in Stadium E bei der Hyperoxiereihe durch die vorherige Gabe von Oligomycin bedingt war. Es ist bekannt, dass es unter Oligomycin zu einem entkoppelten Fluss wegen Hemmung der Phosphorylierung kommen kann. [39]

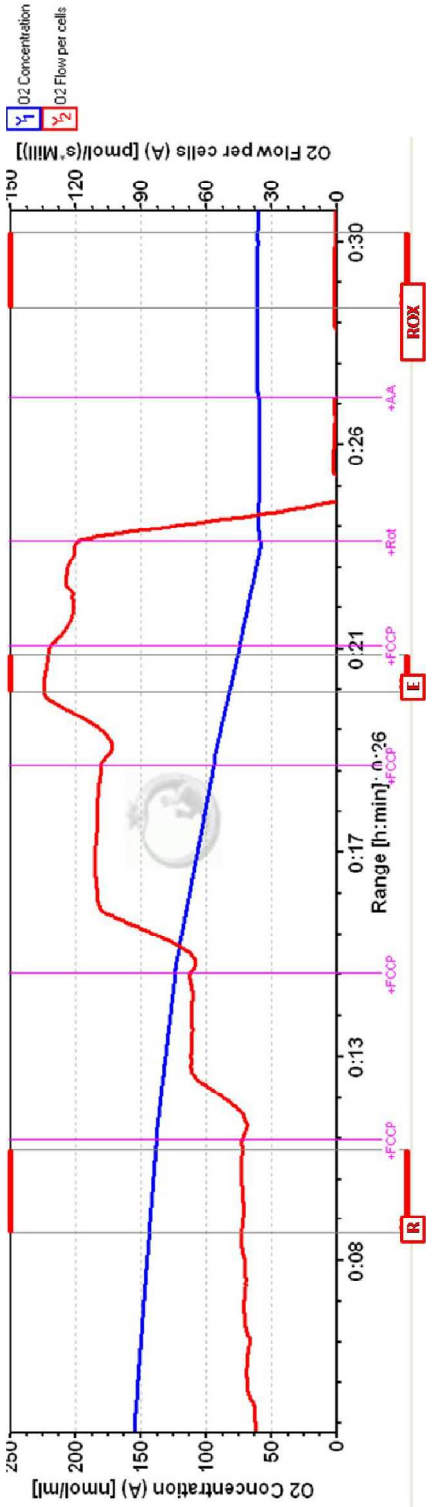


**Abbildung 12: Messprotokoll der Kontrollgruppe im Protokoll „Standard" ohne Oligomycin mit „Oxygraph-2k". Auf der linken Ordinate ist die Sauerstoffkonzentration in Nanomol pro Milliliter (nmol/ml) aufgetragen (blaue Linie). Auf der rechten Ordinate ist der Sauerstoffverbrauch in Picomol pro Sekunde und Milligramm (pmol/s*mg) dargestellt (rote Linie). Auf der Abszisse sind die Substrate und Inhibitoren über die Zeit (in Stunden) protokolliert. Nach Gabe von Pyruvat vor Messbeginn wurde das Stadium R erreicht. Nach Gabe von Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) wurde das Stadium E abgelesen werden. Zum Schluss wurde nach Zugabe von Rotenon (Rot) und Antimycin A (AA) die Residual Oxygen Consumption (ROX) ermittelt.**

Da die Kapazität der Hyperoxiegruppe im Protokoll ohne Oligomycin ebenfalls einen signifikanten Einbruch (p=0,001) zeigte, konnte ein Einfluss von Oligomycin ausgeschlossen werden.

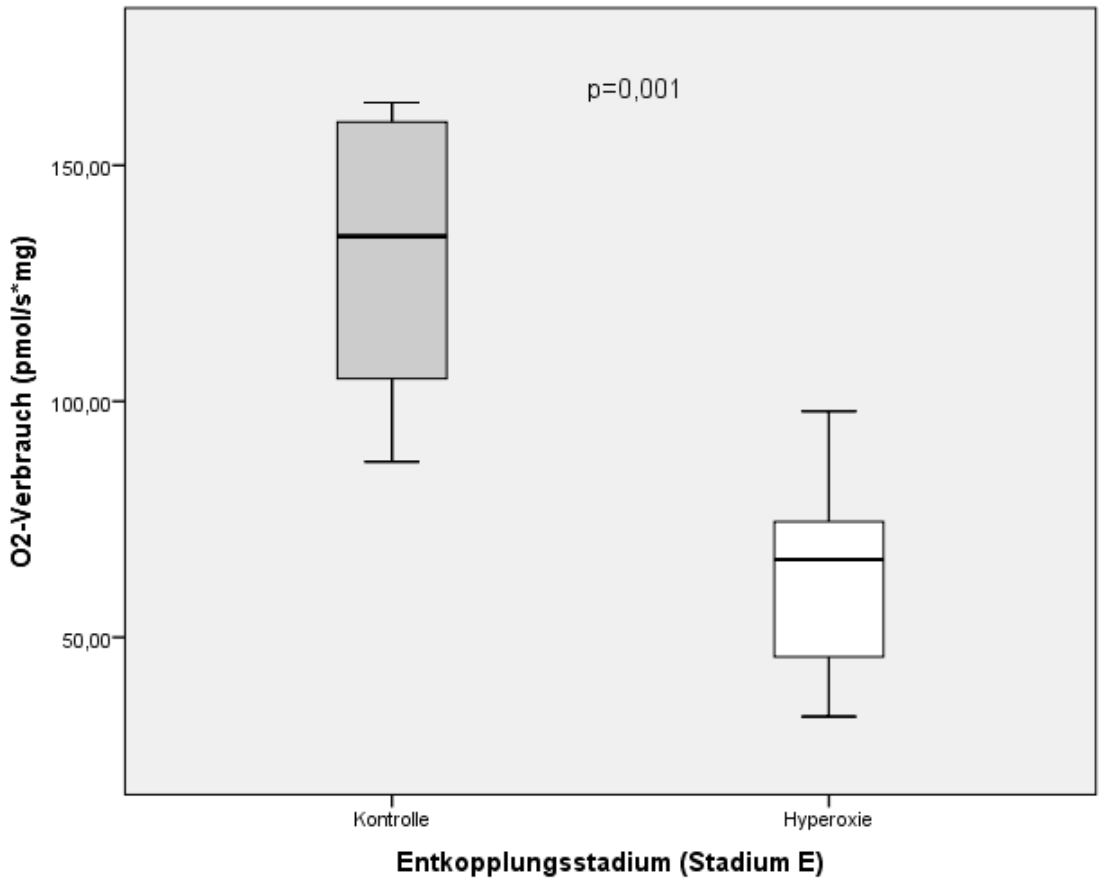


**Abbildung 13: Vergleich der Elektronen Transfer System-Kapazität (Stadium E) der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Standard“ ohne Oligomycin mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=8) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=7), bei Erreichen eines Plateaus nach Gabe von Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP). Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Die Ergebnisse unterscheiden sich signifikant mit p=0,001.**

## *3.3 Hyperoxie bei 25°C*

Durch das Messprotokoll bei 25°C wurde der Oxygraph-2k von Beginn der Kalibration auf 25°C statt auf 37°C eingestellt. Dadurch wurde die Stabilität der Zellen erhöht um zufällige Fehler durch temperaturbedingte Instabilität der Zellen auszuschließen.

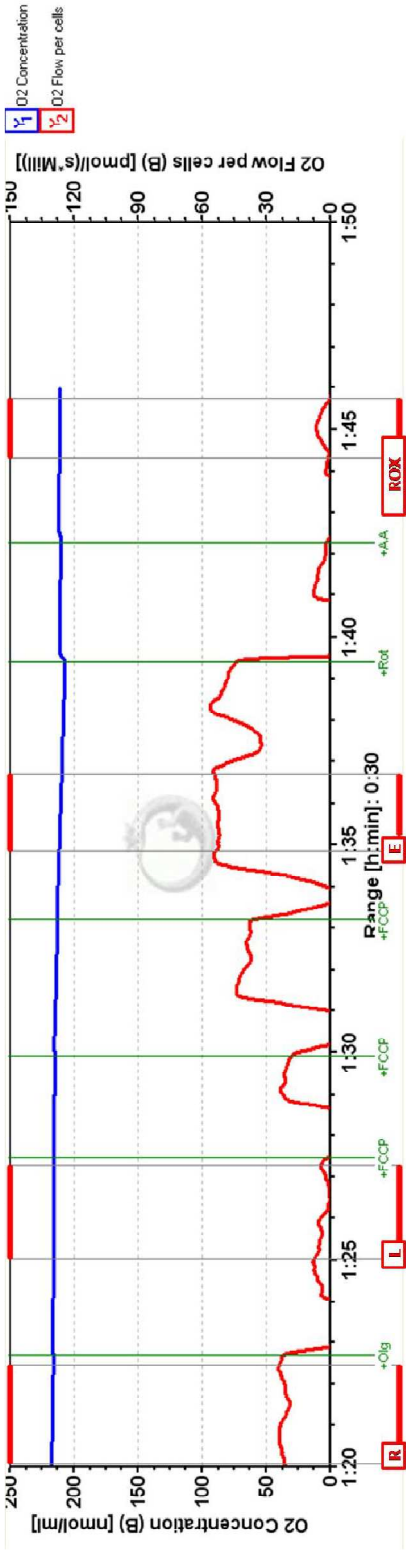


**Abbildung 14: Messprotokoll der Kontrollgruppe im Protokoll „Standard" bei 25°C mit „Oxygraph-2k". Auf der linken Ordinate ist die Sauerstoffkonzentration in Nanomol pro Milliliter (nmol/ml) aufgetragen (blaue Linie). Auf der rechten Ordinate ist der Sauerstoffverbrauch in Picomol pro Sekunde und Milligramm (pmol/s*mg) dargestellt (rote Linie). Auf der Abszisse sind die Substrate und Inhibitoren über die Zeit (in Stunden) protokolliert. Nach der Gabe von Pyruvat vor Messbeginn wurde das Stadium R erreicht. Nach Gabe von Oligomycin (Olg) wurde das Stadium L ermittelt, bevor durch Zugabe von Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) das Stadium E abgelesen wurde. Zum Schluss wurde nach Zugabe von Rotenon (Rot) und Antimycin A (AA) die Residual Oxygen Consumption (ROX) ermittelt.**

Die ermittelten Unterschiede der maximalen Kapazität der Atmungskette waren unter Hypothermie ebenfalls signifikant (p=0,001), sodass ein temperaturbedingter Einfluss auf die maximale Kapazität ausgeschlossen werden konnte.

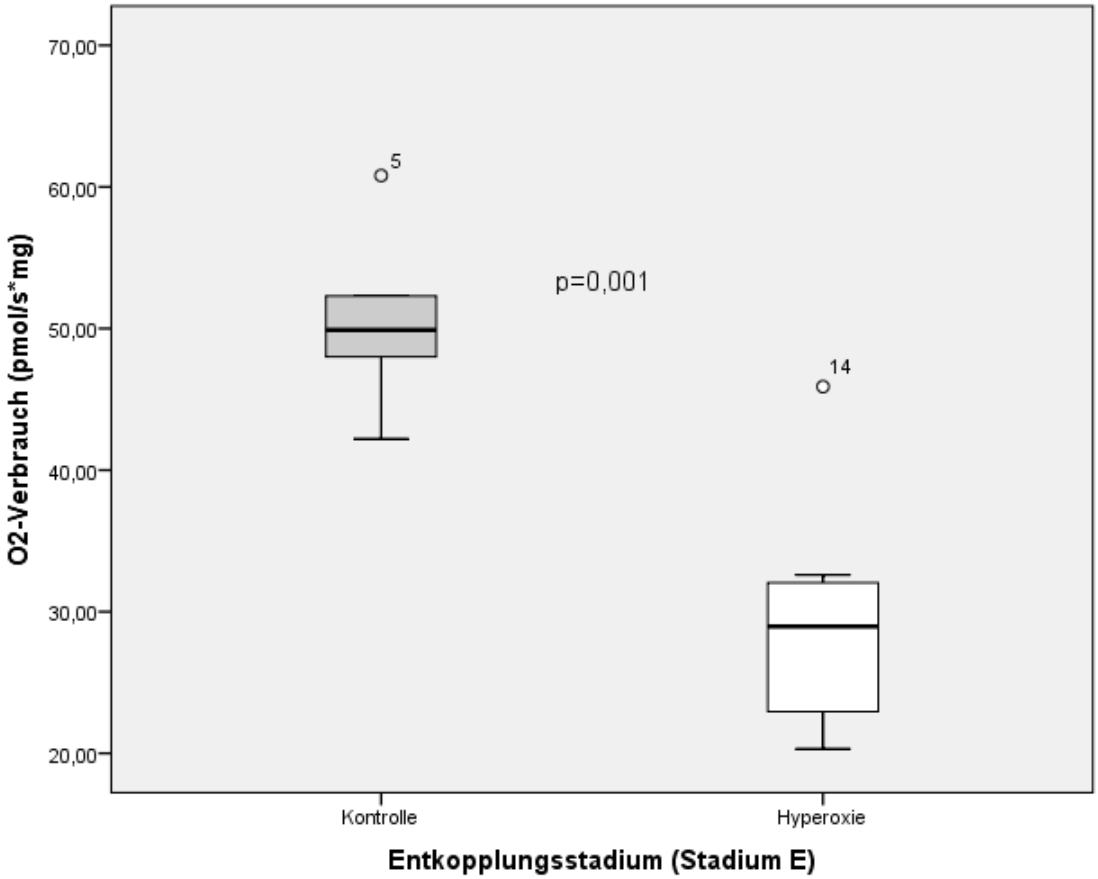


**Abbildung 15: Vergleich des Entkopplungsstadiums (Stadium E) der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Standard“ bei 25°C mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=6) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=8) bei Erreichen eines Plateaus nach Gabe von Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP). Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. $O^5$, $O^{14}$=Ausreißer. Die Ergebnisse unterscheiden sich signifikant mit p=0,001.**

## *3.4 Protokoll: „Complex-entkoppelt“*

### 3.4.1 Messprotokoll

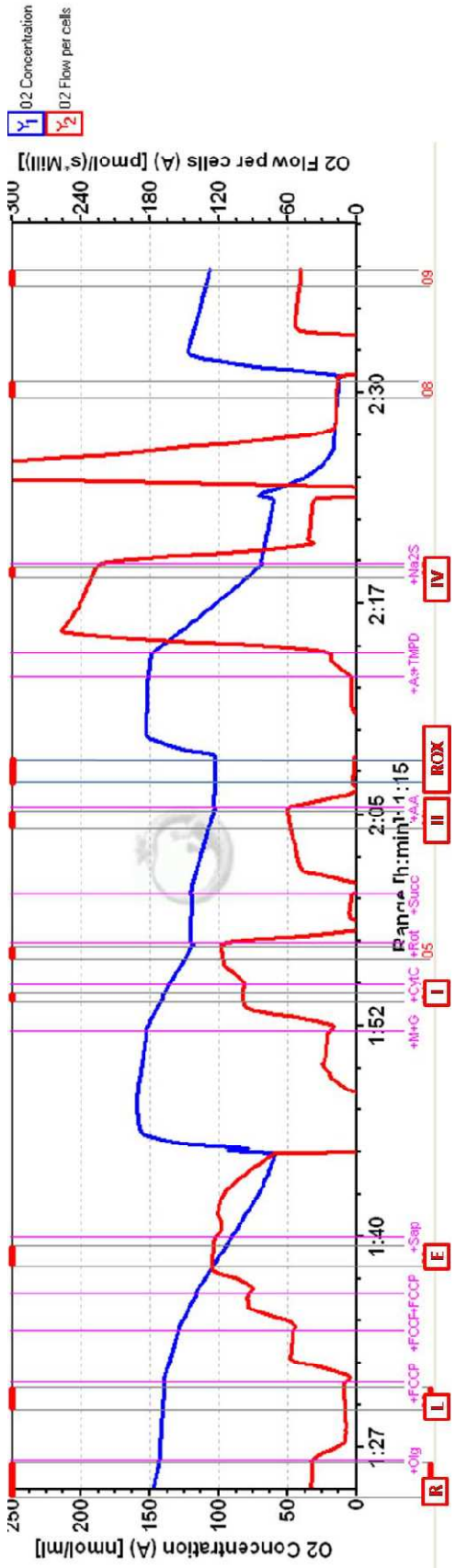


**Abbildung 16: Messprotokoll der Kontrollgruppe im Protokoll „Complex-entkoppelt“ mit „Oxygraph-2k“. Auf der linken Ordinate ist die Sauerstoffkonzentration in Nanomol pro Milliliter (nmol/ml) aufgetragen (blaue Linie). Auf der rechten Ordinate ist der Sauerstoffverbrauch in Picomol pro Sekunde und Milligramm (pmol/s*mg) dargestellt (rote Linie). Auf der Abszisse wurden nach der Gabe von Pyruvat vor Messbeginn folgende Substrate über die Zeit (in Stunden) protokolliert: Oligomycin (Olg), Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP), Saponin (Sap), Malat und Glutamat (M, G), Cytochrom C (CytC), Rotenon (Rot), Succinat (Succ) und Antimycin A (AA). Dann wurde die Kammer kurz geöffnet um eine Aufsättigung mit Sauerstoff zu erzielen und folgende Substrate hinzugegeben: Ascorbat (Asc), Tetramethylphenylendiamin (TMPD) und Natriumsulfat ($Na_2S$). Zum Schluss wurden zur Ermittlung der Autooxidation von TMPD durch die Gabe von Stickstoff ($N_2$) und das erneute Öffnen der Kammer zwei verschiedene Respirationsplateaus (Ziffer 8 & 9) erzielt. Eingetragen sind auch die verschiedenen Stadien der Atmung: Routineatmung (R), Leckageatmung (L), Entkopplungsstadium (E), Komplex I (I), Cytochrom C-Test (Ziffer 5), Komplex II (II), Residual Oxygen Consumption (ROX) und Komplex IV (IV).**

### 3.4.2 Messergebnis

Die ermittelten Werte der Stadien R, L und E wurden nach der ermittelten ROX korrigiert und verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied der Stadien R (p=0,805) und L (p=0,383) im Vergleich der Hyperoxiegruppe mit der Kontrolle gefunden werden. Jedoch wurde ein signifikanter Unterschied im Stadium E gefunden (p=0,017). Bei den Komplexen der Atmungskette wurden für die Komplexe I (p=0,128) und IV (p=0,209) ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Hyperoxiegruppe mit der Kontrolle gefunden. Für Komplex II gab es signifikante Unterschiede (p=0,017).

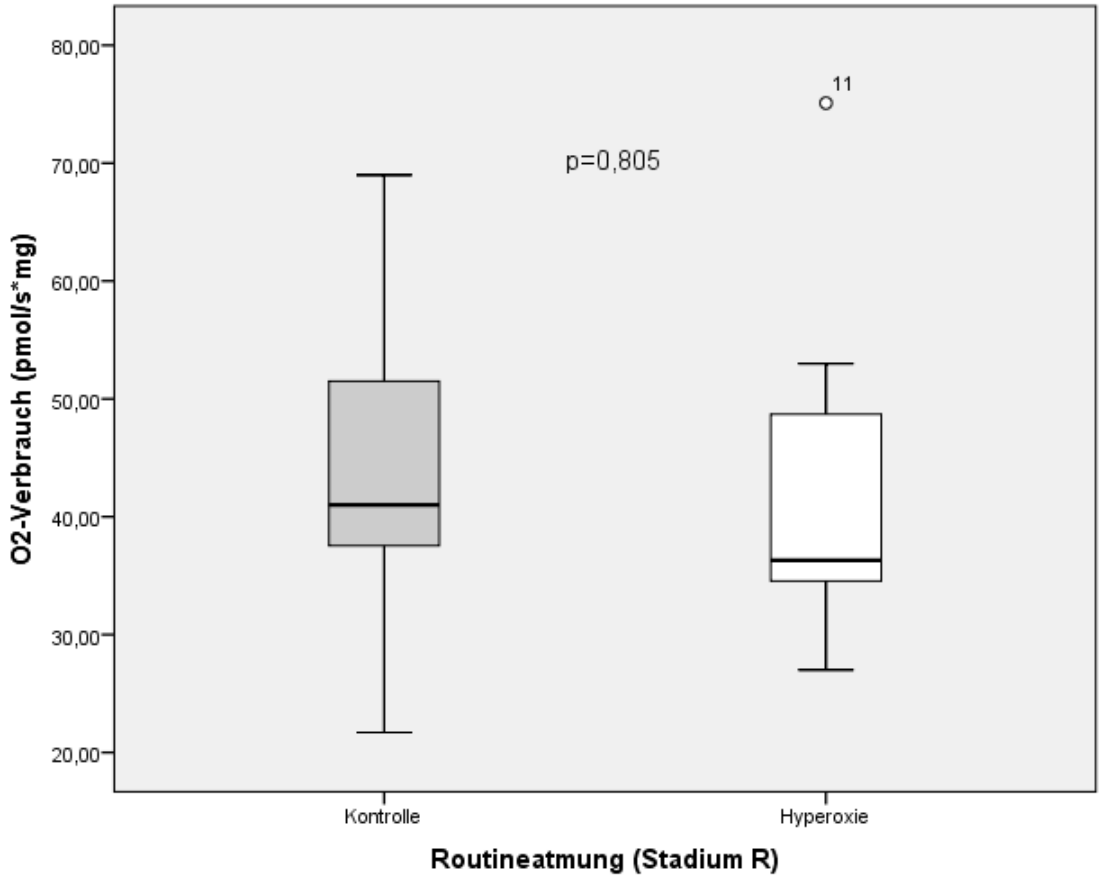


**Abbildung 17: Vergleich der Routineatmung der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-entkoppelt“ mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=7) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=7) bei Erreichen eines Plateaus nach Gabe von Pyruvat zu Messbeginn. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. O11=Ausreißer. Die Ergebnisse unterscheiden sich hier nicht signifikant (p=0,805).**

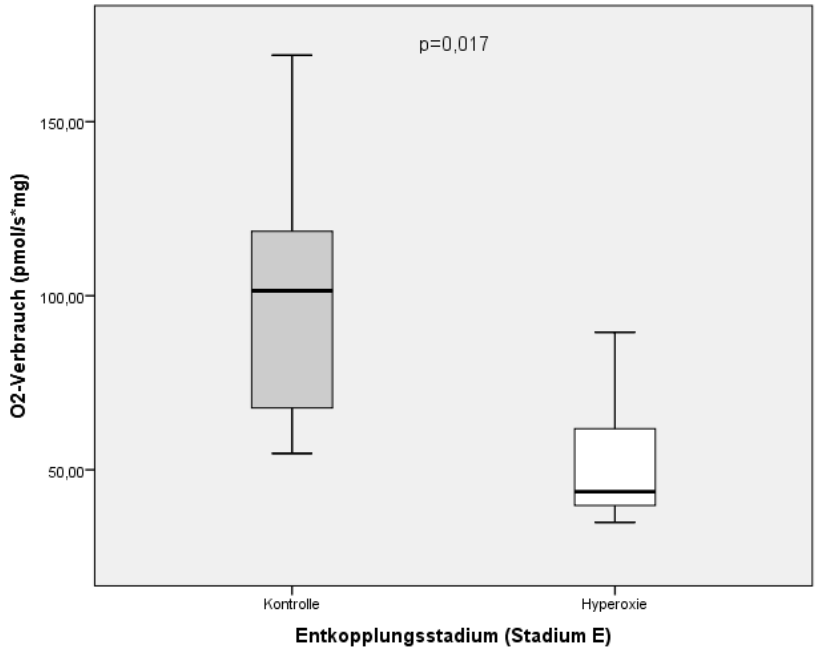


**Abbildung 18: Vergleich des Entkopplungsstadiums (Stadium E) der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-entkoppelt" mit „Oxygraph-2k". In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=7) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=7) bei Erreichen eines Plateaus nach Gabe von Carbonylcyanid-trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP). Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Die Ergebnisse unterscheiden sich signifikant mit p=0,017.**

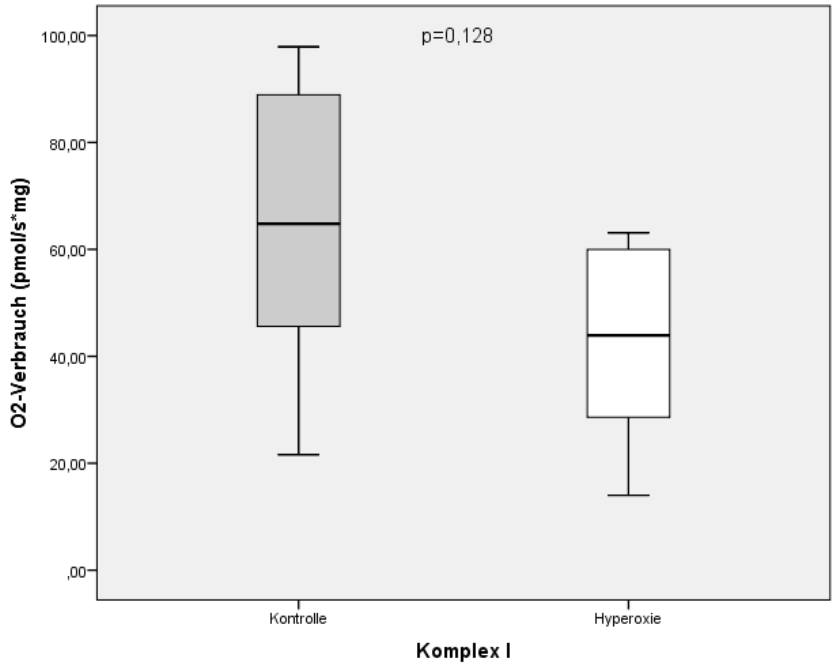


**Abbildung 19: Vergleich der Atmungsaktivität von Komplex I der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-entkoppelt" mit „Oxygraph-2k". In grau die Kontrollgruppe (n=7) und in weiß die Hyperoxiegruppe (n=7) bei Erreichen eines Plateaus nach Permeabilisierung mit Saponin und anschließender Substratgabe (Malat+Glutamat). Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (p=0,128).**

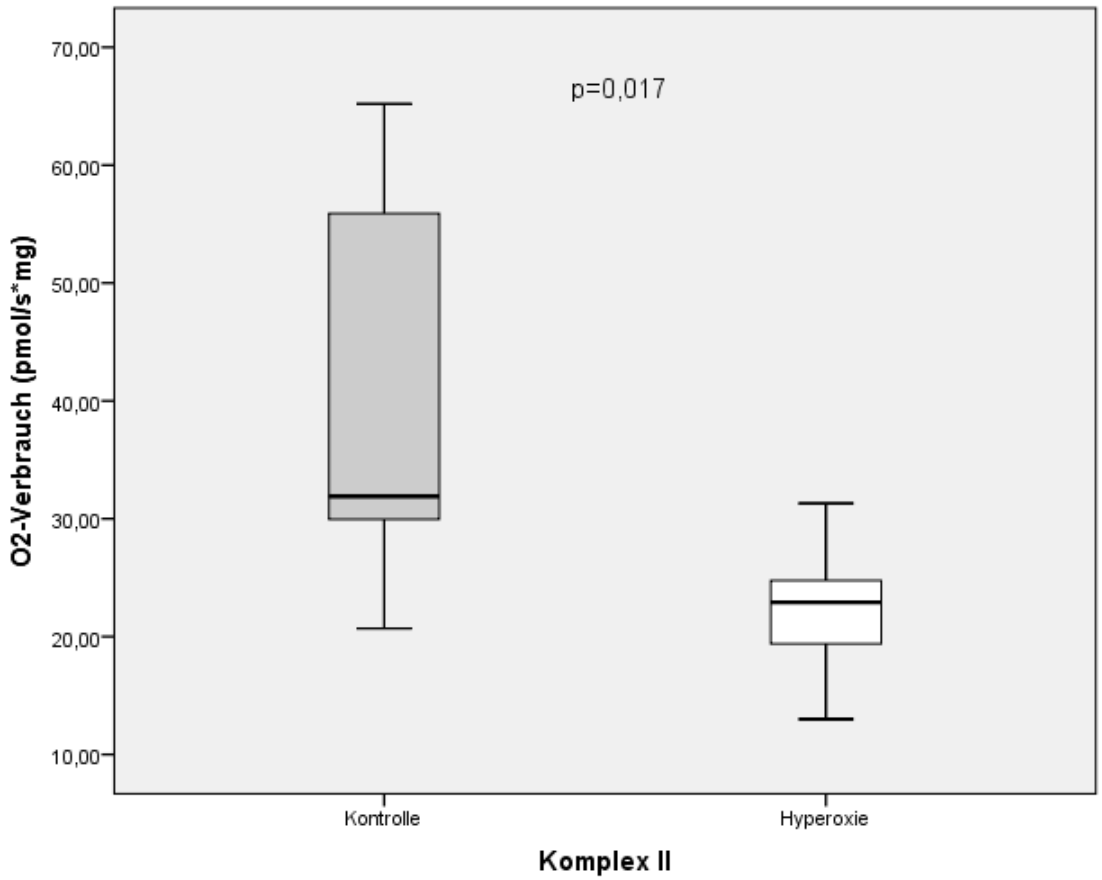


**Abbildung 20: Vergleich der Atmungsaktivität von Komplex II der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-entkoppelt“ mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=7) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=7) bei Erreichen eines Plateaus nach Gabe von Succinat. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Die Unterschiede sind signifikant mit p=0,017.**

Bei der Aktivität von Komplex IV konnte im Protokoll „Complex-entkoppelt“ kein signifikanter Unterschied zwischen der Hyperoxiegruppe und ihren Kontrollen festgestellt werden (p=0,209).

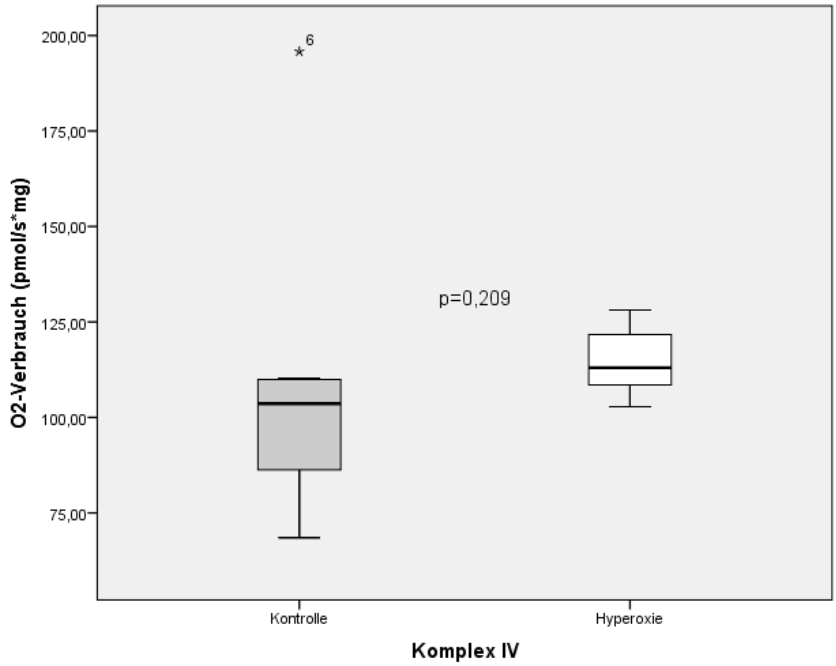


**Abbildung 21: Vergleich der Atmungsaktivität von Komplex IV der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-entkoppelt“ mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=7) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=7) nach Gabe von Tetramethylphenylendiamin (TMPD). Die Werte wurden nach Erstellen einer Eichgeraden auf die Autooxidation von TMPD korrigiert. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. *6=Extremwert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (p=0,209).**

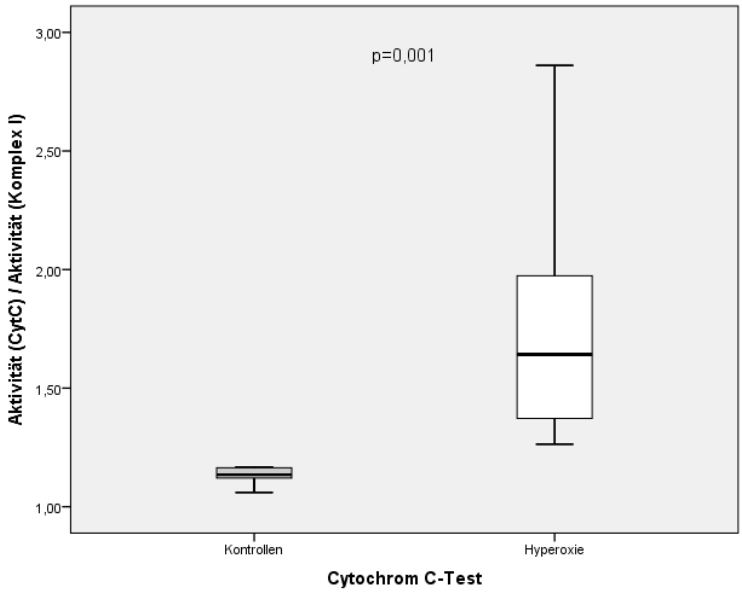


**Abbildung 22: Vergleich der Atemaktivität der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-entkoppelt“ mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=7) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=7) nach Gabe von Cytochrom C und Malat/Glutamat. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Die Unterschiede sind signifikant mit p=0,001.**

## *3.5 Protokoll: „Complex-ADP“*

### 3.5.1 Messprotokoll

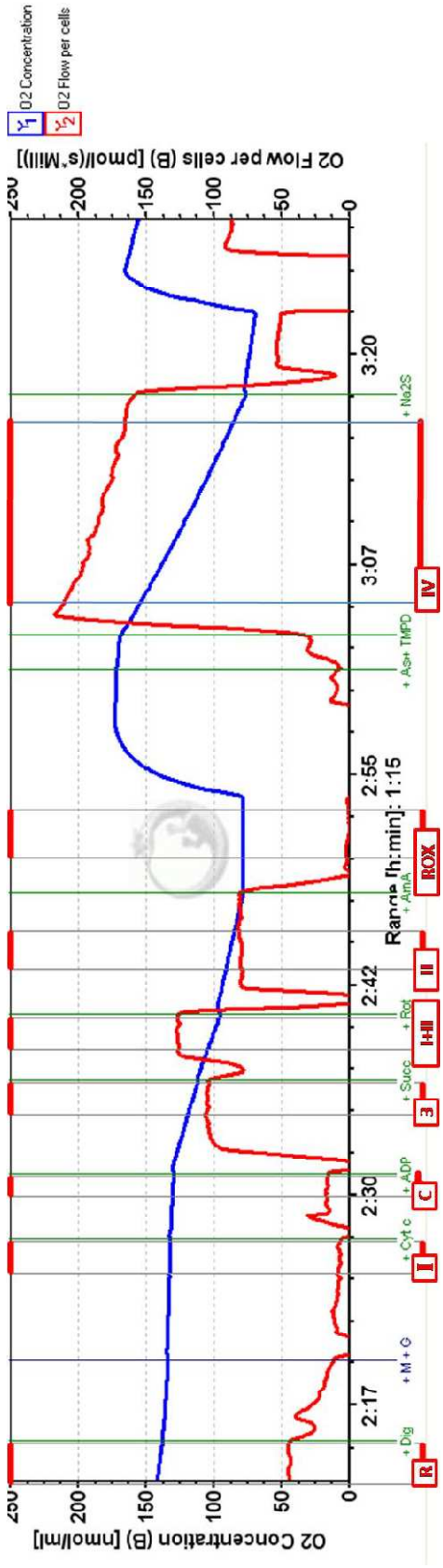


**Abbildung 23: Messprotokoll der Kontrollgruppe im Complex-Protokoll (ADP) mit „Oxygraph-2k“. Auf der linken Ordinate ist die Sauerstoffkonzentration in Nanomol pro Milliliter (nmol/ml) aufgetragen (blaue Linie). Auf der rechten Ordinate ist der Sauerstoffverbrauch in Picomol pro Sekunde und Milligramm (pmol/s*mg) dargestellt (rote Linie). Auf der Abszisse wurden nach der Gabe von Pyruvat vor Messbeginn folgende Substrate über die Zeit (in Stunden) protokolliert: Digitonin (Dig), Malat und Glutamat (M, G), Cytochrom C (CytC), Adenosindiphosphat (ADP), Succinat (Succ), Rotenon (Rot), Antimycin A (AmA), Ascorbat (A), Tetramethylphenylendiamin (TMPD) und Natriumsulfat ($Na_2S$). Dann wurde die Kammer kurz geöffnet um eine Aufsättigung mit Sauerstoff zu erzielen und noch folgende Substrate hinzugegeben: Tetramethylphenylendiamin (TMPD) und Natriumsulfat ($Na_2S$). Zum Schluss wurden zur Ermittlung der Autooxidation von TMPD durch die Gabe von Stickstoff ($N_2$) und das erneute Öffnen der Kammer zwei verschiedene Respirationsplateaus erzielt. Eingetragen sind auch die verschiedenen Stadien der Atmung: Routineatmung (R), Komplex II (II), Cytochrom C-Test (C), Stadium 3 (3), Komplex I+II (I+II), Residual Oxygen Consumption (ROX) und Komplex IV (IV).**

## 3.5.1 Messergebnis

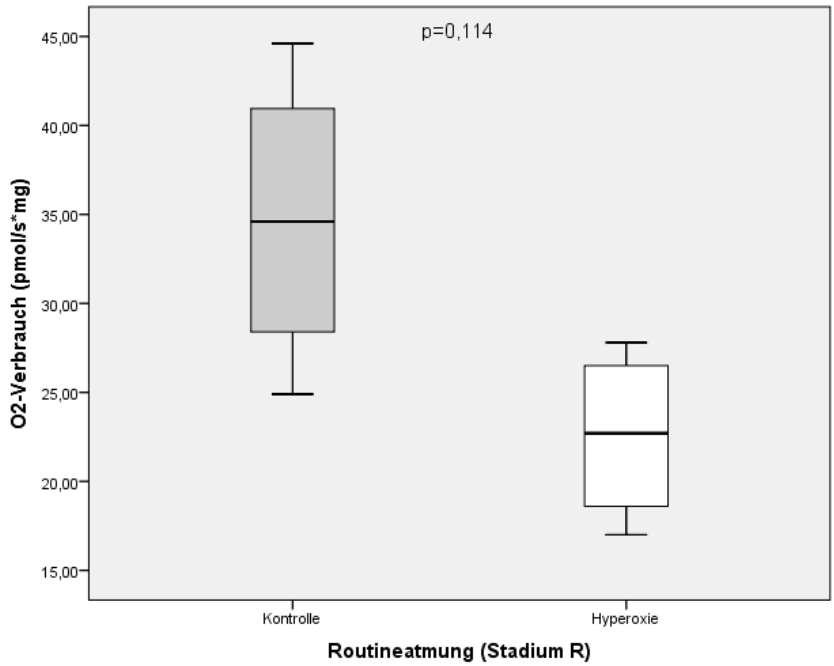


**Abbildung 24: Vergleich des Routinesauerstoffverbrauchs der Hyperoxiegruppe im Protokoll „Complex-ADP“ mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=4) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=4) bei Erreichen eines Plateaus nach Gabe von Pyruvat zu Messbeginn. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Die Ergebnisse unterscheiden sich nicht signifikant (p=0,114).**

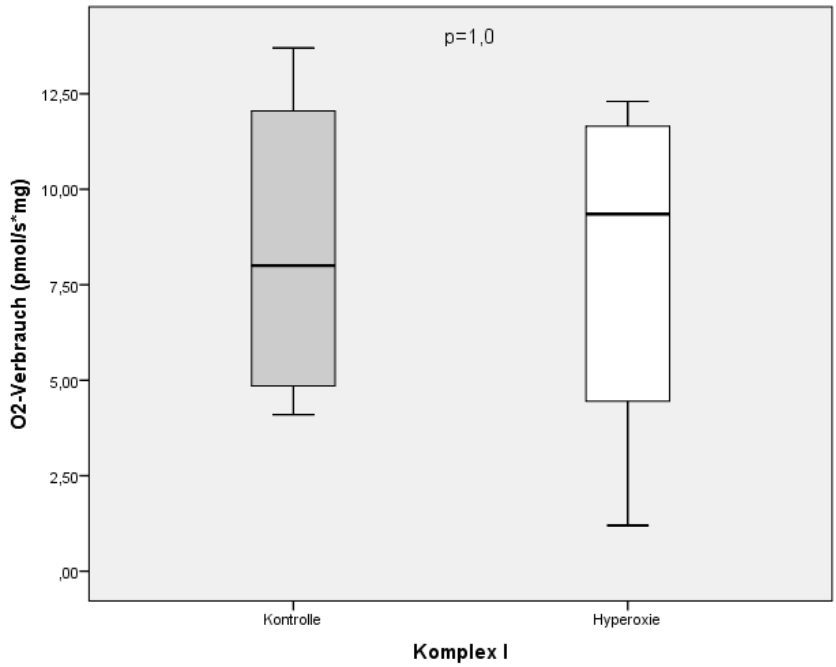


**Abbildung 25: Vergleich der Atmungsaktivität von Komplex I der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-ADP“ mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=4) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=4) bei Erreichen eines Plateaus nach Permeabilisierung mit Digitonin und anschließender Substratgabe (Malat+Glutamat). Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (p=1,0).**

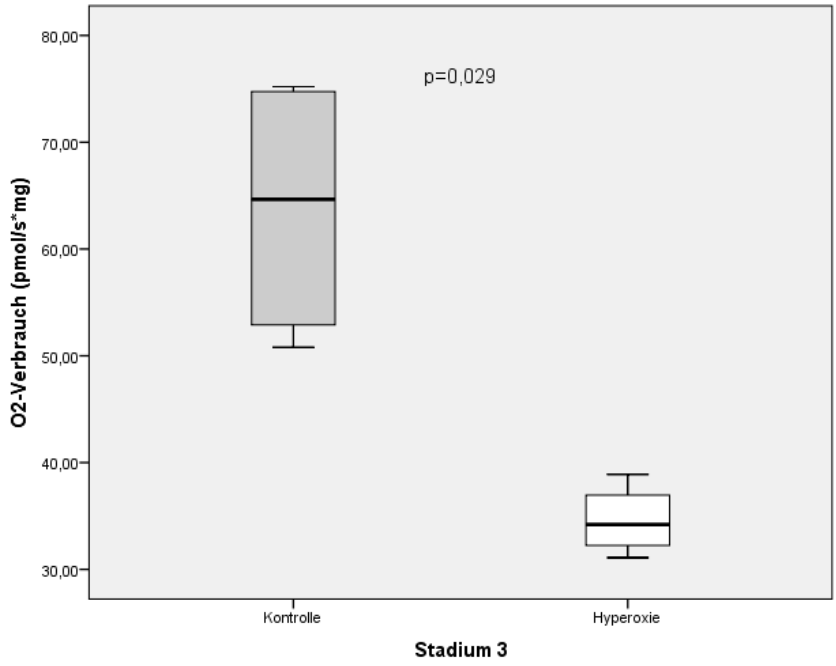


**Abbildung 26: Vergleich der Atmungsaktivität im Stadium 3 der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-ADP“ mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=4) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=4) bei Erreichen eines Plateaus nach der Gabe von Adenosindiphosphat. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Die Unterschiede sind signifikant mit p=0,029.**

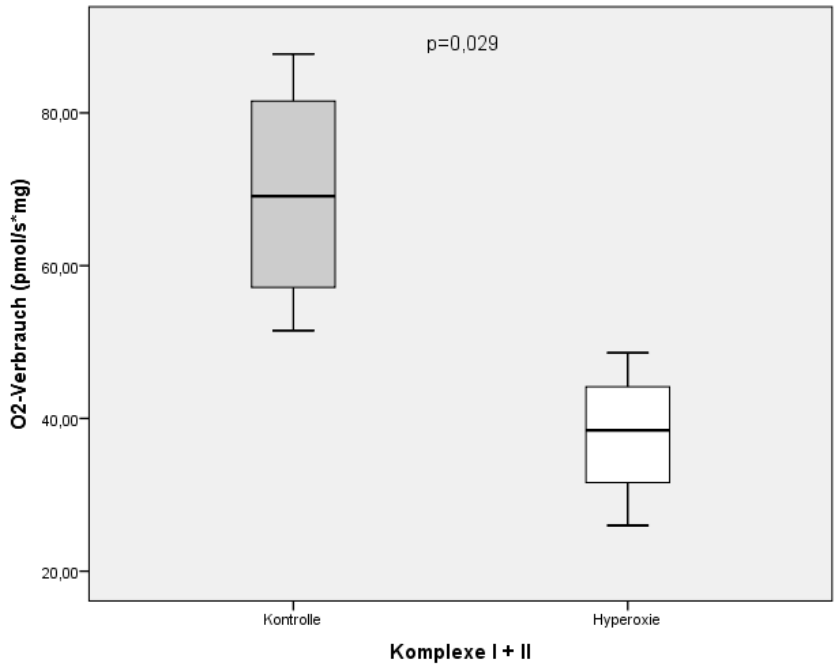


**Abbildung 27: Vergleich der gemeinsamen Atmungsaktivität von Komplex I+II der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-ADP“ mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=4) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=4) bei Erreichen eines Plateaus nach Gabe von Succinat. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Die Unterschiede sind signifikant mit p=0,029.**

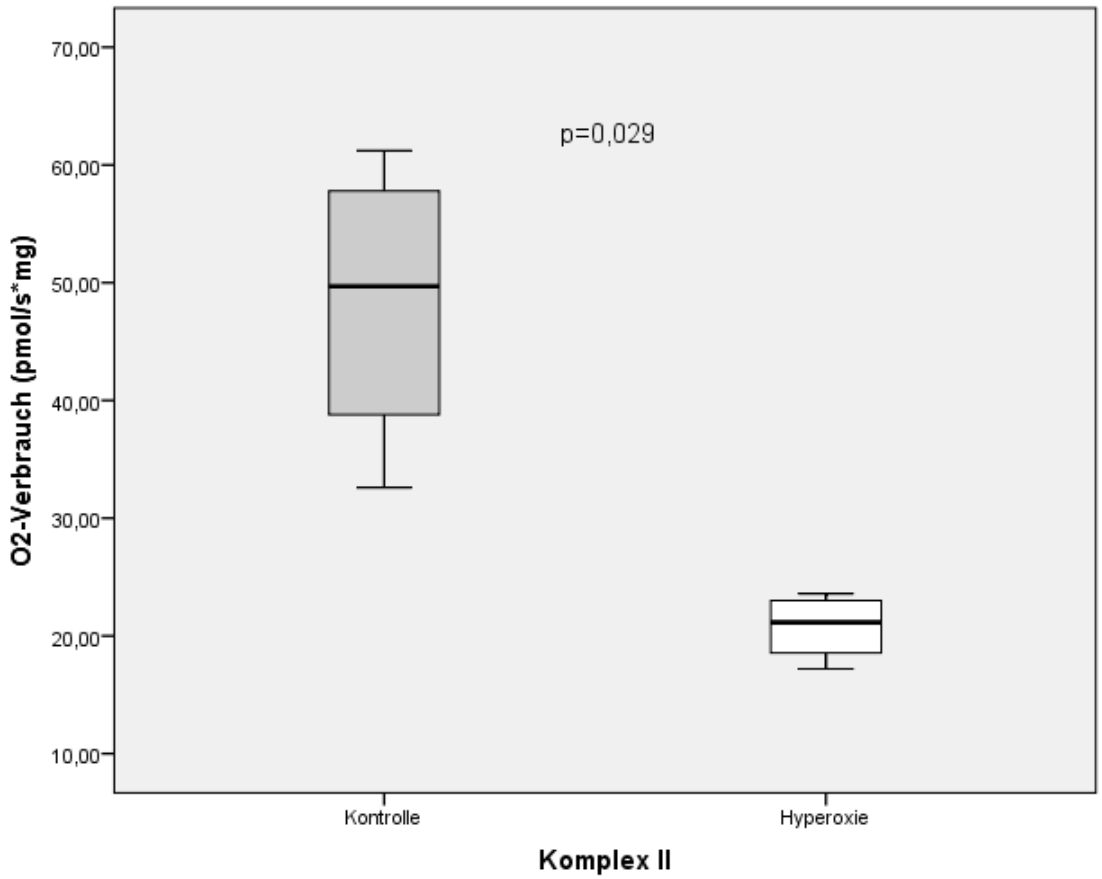


**Abbildung 28: Vergleich der Atmungsaktivität von Komplex II der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-ADP“ mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=4) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=4) bei Erreichen eines Plateaus nach Hemmung mit Rotenon. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Die Unterschiede sind signifikant mit p=0,029.**

Bei der Aktivität von Komplex IV konnte auch im Protokoll „Complex-ADP“ kein signifikanter Unterschied zwischen der Hyperoxiegruppe und den Kontrollen festgestellt werden (p=0,886).

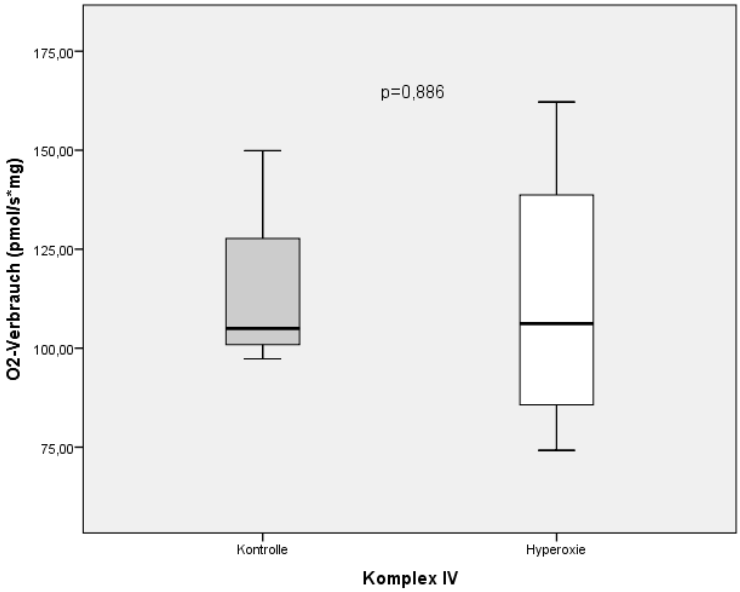


**Abbildung 29: Vergleich der Atmungsaktivität von Komplex IV der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-ADP“ mit „Oxygraph-2k“. In grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=4) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=4) bei Erreichen eines Plateaus nach Gabe von Tetramethylphenylendiamin (TMPD). Die Werte wurden nach Erstellen einer Eichgeraden auf die Autooxidation von TMPD korrigiert. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (p=0,886).**

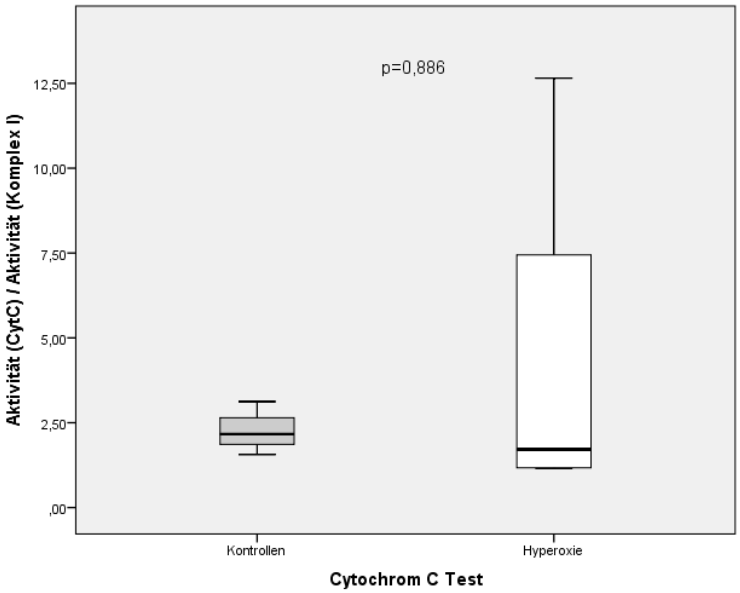


**Abbildung 30: Vergleich der Atemaktivität der Alveolarmakrophagen im Protokoll „Complex-ADP“ mit „Oxygraph-2k“. In Grau die Kontrollgruppe (Fallzahl n=4) und in weiß die Hyperoxiegruppe (Fallzahl n=4) nach Gabe von Cytochrom C und Malat/Glutamat. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (p=0,886).**

## *3.6 Auswirkung der Kopplung auf die Kapazität*

Zum Vergleich der Atmungskapazität wurde das ADP-stimulierte Stadium 3 (Oxphos Kapazität) im Protokoll „Complex-ADP“ dem Entkopplungsstadium (Stadium E) im Protokoll „Complex-entkoppelt“ gegenübergestellt. Damit konnte analysiert werden, inwieweit die ATP-Synthase in gekoppeltem Zustand die Atmungskette limitiert.

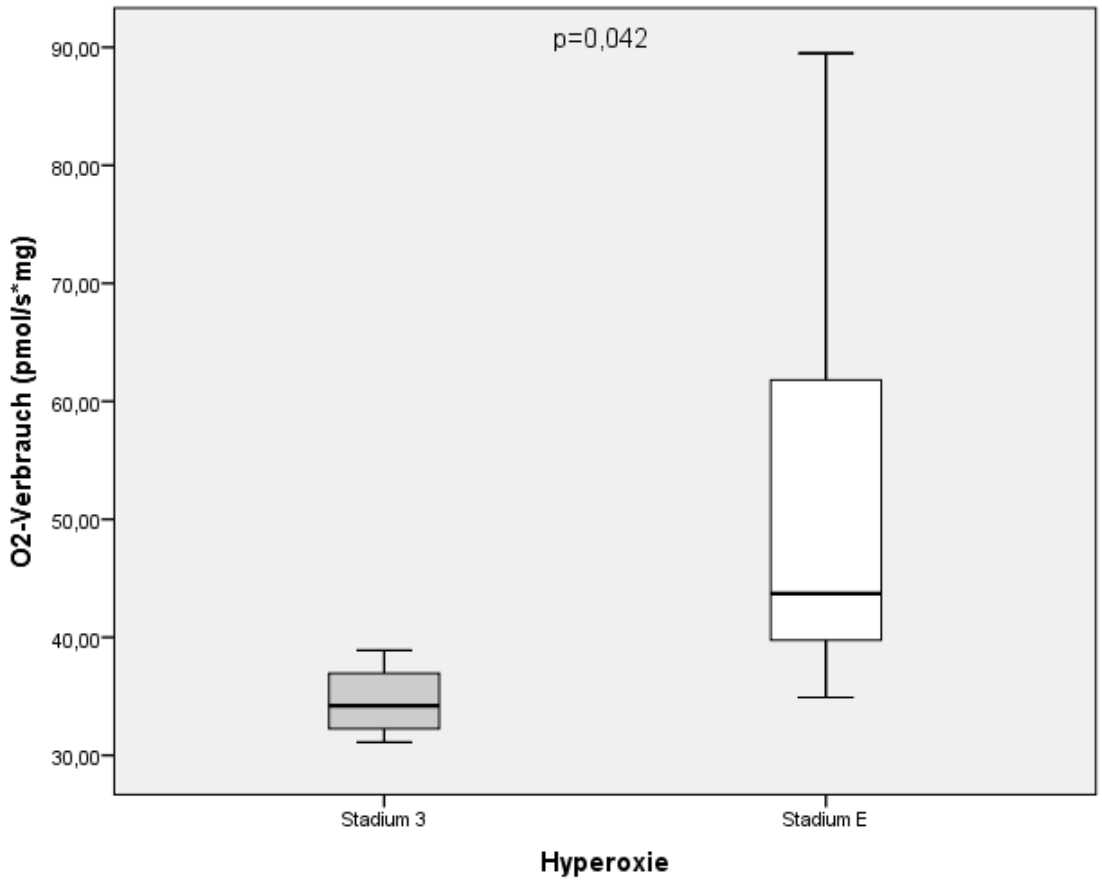


**Abbildung 31: Vergleich der Kapazität der oxidativen Phosphorylierung nach Gabe von Adenosindiphosphat (Stadium 3) mit der Kapazität des Elektronen Transport Systems (Stadium E) nach Entkopplung durch Carbonylcyanid-*p*-trifluoro-methoxyphenylhydrazon (FCCP) mit „Oxygraph-2k“. Gegenübergestellt sind die Hyperoxiegruppen nach Exposition unter normobarer Hyperoxie der Protokolle „Complex-ADP“ in grau und „Complex-entkoppelt“ in weiß. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum.. Die gefundenen Unterschiede sind signifikant mit p=0,042.**

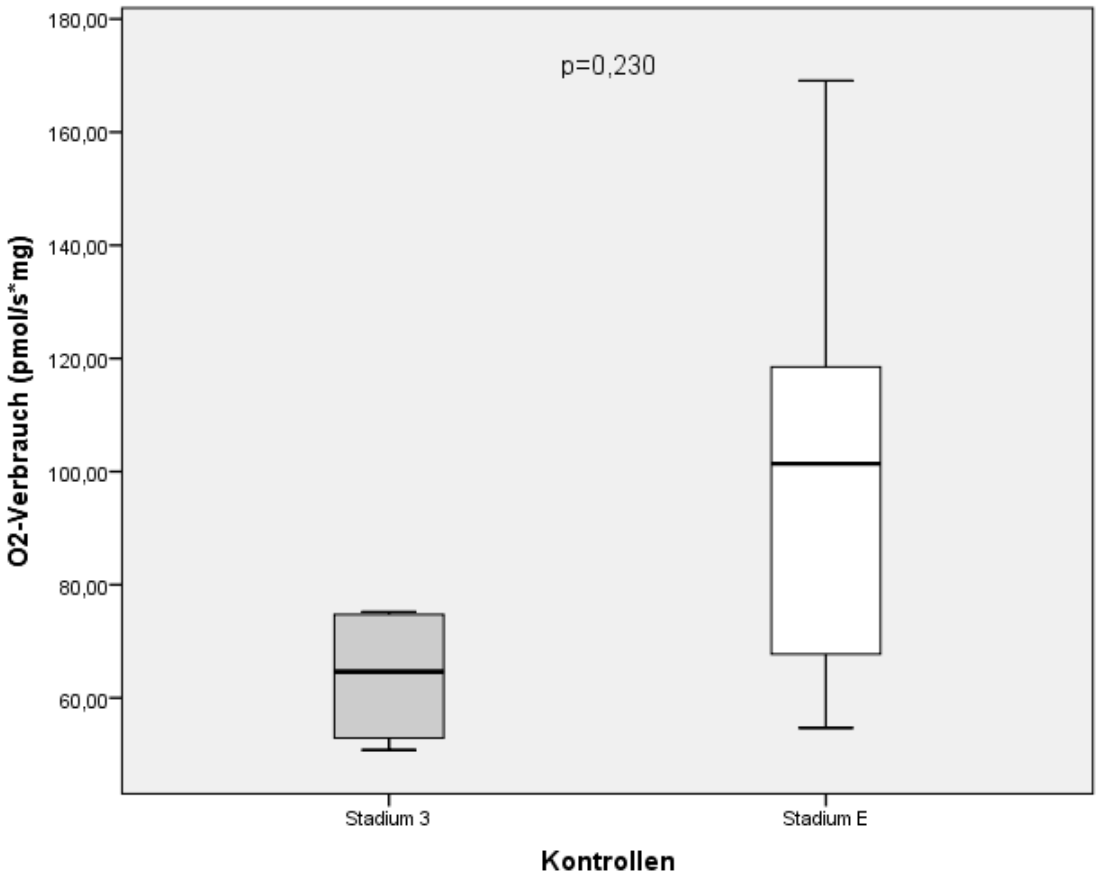


**Abbildung 32: Vergleich der Kapazität der oxidativen Phosphorylierung nach Gabe von Adenosindiphosphat (Stadium 3) mit der Kapazität des Elektronen Transport Systems (Stadium E) nach Entkopplung durch Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) mit „Oxygraph-2k". Gegenübergestellt sind die Kontrollgruppen ohne normobare Hyperoxie der Protokolle „Complex-ADP" in grau und „Complex-entkoppelt" in weiß. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Es wurden keine signifikanten unterschiede gefunden (p=0,230).**

Zur Überprüfung der Veränderung im Kopplungsgrad wurde auch die Phosphorylation Control Ratio (P/E-Ratio) berechnet und verglichen.

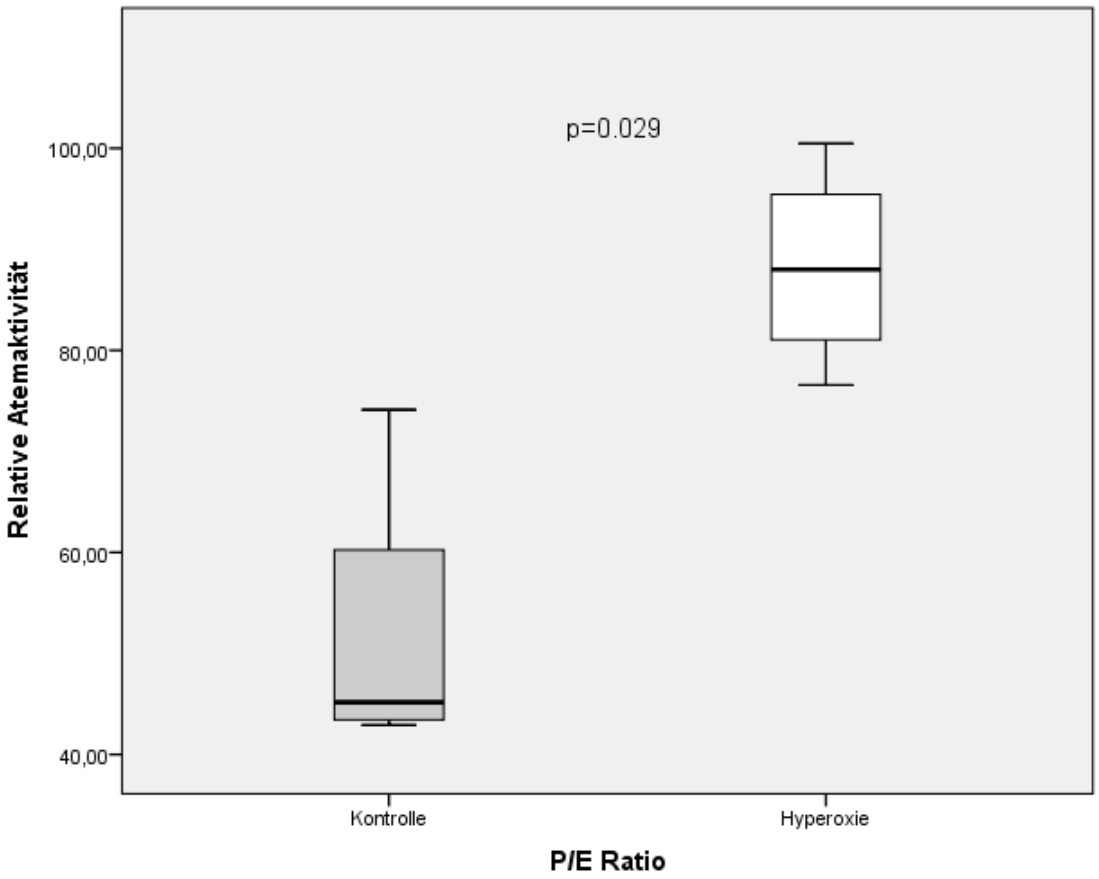


**Abbildung 33: Dargestellt ist die P/E Ratio mit „Oxygraph-2k". Der Quotient aus Adenosindiphosphat (ADP) aktivierter Aktivität (Stadium P) und Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) aktivierter Atemaktivität (Stadium E). Gegenübergestellt sind die Kontrollen in grau und die Hyperoxiegruppe in weiß. Dargestellt sind Minimum, 25-Prozent-Quantil, Median, 75-Prozent-Quantil und Maximum. Die Unterschiede sind mit p=0,029 signifikant.**

## *3.7 Zusammenfassung*

Eine 24-stündige in vitro Exposition von Alveolarmakrophagen (AMJ2-C11) in normobarer Hyperoxie beeinflusst die Aktivität der Atmungskette. Gleich behandelte Zellen der identischen Zellreihe und Passage zeigten unter Sauerstoffexposition diverse Veränderungen: So wurde die maximale Kapazität des Elektronen Transport Systems verringert, die Integrität der Zelle beschädigt und vor allem die Aktivität von Komplex II vermindert. Außerdem zeigte der Cytochrom C Test ein signifikanten Anstieg der Zellatmung nach Cytochrom C Gabe.

Desweiteren kam es zu einer Beeinträchtigung der Kopplung des Elektronen Transport Systems an die Oxidative Phosphorylierung. So konnte durch die P/E-Ratio gezeigt werden, dass durch Schäden am Elektronentransportsystem der Kopplungsgrad der Atmungskette verringert wurde.

# 4. Diskussion

## *4.1 Übersicht*

Durch die Experimente sollte untersucht werden ob eine normobare Hyperoxie von 24 Stunden die mitochondriale Atmungsaktivität beeinflusst. Im Einzelnen sollte dann gezeigt werden, ob einzelne Komplexe unterschiendlich betroffen waren und ob eine Auswirkung auf die Kopplung der Atmungskette an die oxidative Phosphorylierung zu finden war. Dazu wurden mögliche Veränderungen der Atmungskette mit dem Oxygraph-2k untersucht. Als Zellmodell wurden Alveolarmakrophagen vom Typ AMJ2-C11 verwendet. Zur Beurteilung der Atmungskette und ihrer Bestandteile wurden die Zellen gezielt unter Einfluss bestimmter Substrate und Inhibitoren während verschiedener Stadien der zellulären Atmung auf ihren Sauerstoffverbrauch untersucht. Um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu quantifizieren wurden die gemessenen Werte in Bezug zur maximal entkoppelten Atmungsaktivität unter FCCP bzw. ADP gesetzt (Stadium E bzw. Stadium 3). Dadurch konnten die Daten verglichen und ausgewertet werden.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikant erniedrigte Kapazität des Elektronen Transportsystems (Stadium E) unter normobarer Hyperoxie. Im Detail zeigte sich dabei eine erniedrigte Aktivität von Komplex II im Protokoll „Complex-entkoppelt“ nach 24 Stunden normobarer Hyperoxie. Im Protokoll „Complex-ADP“ konnte eine signifikante Beeinträchtigung unter normobarer Hyperoxie für Komplex II und das Stadium 3 gezeigt werden. Außerdem kam es zu einer Beeinträchtigung des Kopplungsgrades. Die Routineatmung sowie die Leckageatmung zeigten ebenso wie die Aktivität von Komplex IV keine signifikanten Veränderungen unter normobarer Hyperoxie.

## *4.2 Messung mit dem Oxygraph 2k*

Die Methode der hochauflösende Respirometrie ermöglichte die Untersuchung von Effekten der normobaren Hyperoxie auf die Atmungskette mit dem Oxygraph-2k. Dabei handelte es sich um eine sehr genaue Methode, da der Oxygraph Konzentrationsänderungen im Pico-Mol-Bereich messen konnte. Damit wurde es möglich feinste Interaktionen der mitochondrialen Elemente aufzuzeichnen und zu analysieren. Durch selektive Untersuchung einzelner Komponenten der Atmungskette erhielt man so ein vielschichtiges Bild der mitochondrialen Funktionen und ihrer Integrität. [38, 40]

Vergleichbare Verfahren zur Analyse von Aktivität und Integrität zellulärer Bestandteile wie die spektrophotometrische Messung würden im Vergleich, durch Extinktionsänderungen lediglich die indirekte Bestimmung einer mitochondrialen Funktion ermöglichen. Die Messung von Membranpotentialen und deren Änderung würde nur das Resultat der Aktivität der Atmungskette darstellen, weder aber deren Interaktion untereinander noch deren Metabolismus. [59]

Die Ursache für den Sauerstoffverbrauch wurde auch mit der Respirometrie nicht direkt beobachtet. Dennoch ermöglichte die Anwendung von selektiven Substraten und Inhibitoren die Zuordnung von Sauerstoffverbrauch zu bestimmten Komplexen der Atmungskette. So zeigte zum Beispiel der akute Abfall des Sauerstoffkonsums bei Gabe von Antimycin A kaum noch Restaktivität (ROX). Dennoch ließ sich ein versteckter Sauerstoffverbrauch während der ROX durch andere Zellorganellen wie Peroxisomen nicht ausschließen. [38, 40] Messfehler und Artefaktbildung durch diffusions- und messbedingten Sauerstoffverlust konnte durch die Verwendung sachgemäßer Materialien mit niedriger Sauerstofflöslichkeit ausgeschlossen werden. Grenzeffekte wurden durch optimales Oberflächen/Volumen Verhältnis in der Kammer minimiert. [37]

## *4.3 Zellmodell*

Als Zellmodell wurden Alveolarmakrophagen des Typs AMJ2-C11 verwendet. Es handelte sich dabei um eine Zelllinie von In-Vitro-Kulturen. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass der oxidative Stress durch normobare Hyperoxie in vitro dem oxidativen Stress in vivo gleicht. [91] Dennoch muss davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse nicht direkt auf die Zelle in vivo übertragen werden können. Das Zellmodell eignete sich dennoch gut, da Alveolarmakrophagen an höhere Sauerstoffkonzentrationen gewöhnt sind als andere Zellen. Deshalb waren sie auch nach Sauerstoffexposition stabiler und ermöglichen damit die Experimente. Weitere Experimente mit Primärkulturen und anderen Zellreihen wie RAW-Makrophagen wären ebenfalls interessant und könnten eventuell die Ergebnisse bestätigen.

Die verwendeten Alveolarmakrophagen wurden durch Infektion mit dem Retrovirus J2 immortalisiert. Der Retrovirus trägt die Onkogene v-raf und v-myc. Diese Onkogene könnten in den Metabolismus der Zelle und damit auch der Mitochondrien eingreifen. Durch mehrere Studien konnte allerdings kein wesentlicher Unterschied zu anderen Zellen festgestellt werden. [6, 44, 50, 72]

Wir verwendeten zunächst intakte Zellen, die wir für die Analyse der einzelnen Komplexe permeabilisierten. Ein klarer Vorteil von intakten Zellen ist das Vorhandensein des physiologischen Milieus der Zelle. Dadurch kommt es zu deutlich weniger Artefakten als beispielsweise bei isolierten Mitochondrien. Da die zelleigenen Substrate und Ionen der intakten Zelle in physiologischen Konzentrationen vorliegen, lässt sich dadurch vor allem der Routinezustand der Zelle sehr realitätsgetreu darstellen. Für die Analyse der Mechanismen von mitochondrialen Defekten enthält das Modell der intakten Zelle einige Einschränkungen: Da einige Substrate wie zum Beispiel auch ADP nicht durch die Zellmembran diffundieren können, kann es zu einer Hemmung verschiedener Komponenten der Atmungskette wie auch der OXPHOS-Kapazität kommen. [44]

Deshalb müssen für die detaillierte Analyse von Elementen der Atmungskette entweder isolierte Mitochondrien gewählt werden oder es muss zur Anwendung von milden Detergenzien wie Digitonin oder Saponin kommen. [65, 86, 79]

Die Exposition unter normobarer Hyperoxie wurde jeweils mit 24 Stunden durchgeführt. Expositionen von 12 und 48 Stunden, sowie eventuelle Zwischenschritte wären ebenfalls interessant. Man hätte damit eventuell die Möglichkeit den Beginn der Schäden aufzeigen können bzw. eine Progredienz anzuzeigen.
Eine 48-stündige Exposition wäre auch deshalb interessant, weil die geschädigten Zellen in der Regel 24 Stunden zur Regeneration benötigen. So könnte man Aufschluss erhalten über die veränderte Regeneration der Zellphysiologie, nach stattgefundener Schädigung.

## *4.4 Beeinträchtigung unter normobarer Hyperoxie*

### 4.4.1 Maximale Kapazität des Elektronentransportsystems

Die Werte der Hyperoxiegruppe im Protokoll „Standard“ für das Stadium E lagen dabei 33% unter denen der Kontrollgruppe. Die Werte der Hyperoxiegruppe im Protokoll „Complex-entkoppelt“ lagen sogar 57% unter den Werten ihrer Kontrollen. Durch eine normobare Hyperoxie von 24 Stunden kommt es also zum Abfall der maximalen Kapazität des Elektronentransportsystems der Atmungskette von Alveolarmakrophagen. Diese Tatsache bestätigt vorausgegangene Studien. Es wurde jeweils beschrieben, dass es unter normobarer Hyperoxie zu einem Abfall der Kapazität des Elektronentransportsystems kommt. [3, 19, 24, 93]

### 4.4.2 Komplex I + II

Betrachtet man in der permeablisierten Zelle die Komplexe einzeln so fällt auf, dass es nach Hyperoxie zu starken Abfällen der Komplexaktivitäten kommt. Ein signifikanter Unterschied (p=0,017 Protokoll „Complex-entkoppelt“; p=0,029 Protokoll „Complex-ADP“) konnte hier allerdings nur für die Succinat-Dehydrogenase nachgewiesen werden. Auch wenn Komplex I ebenfalls verringerte Aktivität zeigte. Dennoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Der starke Abfall in der Aktivität von Komplex II ist damit der ausschlaggebende Faktor für den gezeigten Einbruch der maximalen Kapazität des Elektronentransportsystems. Dies bestätigt eine Studie von Scatena et al., die gezeigt hatte, dass es nach normobarer Hyperoxie zu einem Abfall der Aktivität der Succinat-Dehydrogenase in Hamsterovarien durch Superoxidbildung kommt. [91] In anderen Studien konnten ähnliche Veränderungen beschrieben werden. Sepehr et al. und Kumuda beschrieben in ihren Studien eine Hemmung der Aktivität sowohl von Komplex I wie auch von Komplex II.[24, 94]

### 4.4.3 Cytochrom C Test

Im Protokoll „Complex-entkoppelt“ konnte in der Hyperoxiegruppe nach Gabe von Cytochrom C ein Anstieg um das 1,6-fache beobachtet werden, während es in der Kontrolle zu keinem starken Anstieg kam. Dieser signifikante Unterschied (p=0,001) ist zunächst auf Schäden der äußeren Mitochondrienmembran durch die normobare Hyperoxie zurückzuführen. Es ist allerdings zu beachten, dass im Protokoll „Complex-ADP“ kein signifikanter Unterschied im Cytochrom C Test gefunden werden konnte.

Der Verlust von Cytochrom C könnte also auch durch Schäden an der Zellintegrität durch Saponin zuzuschreiben sein. Die Anwendung von Saponin beeinflusst wie oben beschrieben die Mitochondrienmembran in der Regel nur in hohen Konzentrationen. Da die Titration von Saponin jedoch durchgeführt wurde, bis der erste Abfall der Atmungsaktivität erreicht war, kann ausgeschlossen werden, dass bei jeder einzelnen Versuchsreihe eine Konzentration erreicht wurde, die einen Schaden an der äußeren Mitochondrienmembran hinterlässt. [38]

### 4.4.4 Auswirkung der Kopplung auf die Kapazität

Schließlich sollte durch die Arbeit untersucht werden ob eine normobare Hyperoxie Einfluss auf die Kopplung der Atmungskette hat. Dazu wurde die Atemaktivität nach Stimulation durch ADP in gekoppelten Zustand im Protokoll „Complex-ADP“ (Stadium 3) mit der durch FCCP entkoppelten Atmungsaktivität im Protokoll „Complex-entkoppelt“ (Stadium E) verglichen. Die Werte für Stadium 3 lagen dabei unter denen für Stadium E. Signifikante Unterschiede ($p=0,042$) konnten nur in der Hyperoxiegruppe nachgewiesen werden. Die ermittelten Werte nach Aktivierung durch ADP lagen dabei 22% unter den Werten nach FCCP Gabe. Bestätigt wurde das Ergebnis auch durch Berechnung der „Phosphorylation Control Ratio“ (P/E-Ratio). Die P/E-Ratio betrug für die Hyperoxiegruppe 0,9 und für die Kontrollen 0,5. Demnach schöpfte die oxidative Phosphorylierung der Kontrollgruppe 50% der ETS-Kapazität aus, während in der Hyperoxiegruppe 90% ausgeschöpft wurden. Demnach stehen der Hyperoxiegruppe weniger Reserven zur Verfügung, was Rückschlüsse auf die gestörte Physiologie zulässt. Der Unterschied der P/E-Ratio war mit $p=0,029$ statistisch signifikant.

Demnach wirkt sich eine normobare Hyperoxie auch auf die Kopplung der Atmungskette an die oxidative Phosphorylierung aus. Durch Schäden am Elektronentransportsystem kommt es zu einer Entkopplung der Atmungskette.

Die Kontrolle des Phosphorylierungssystems über das ETS lag in beiden Gruppen dennoch vor ($P/E\text{-Ratio} < 1$). [41]

## *4.5 Schlussfolgerung*

### 4.5.1 Interpretation

Durch die erhobenen Daten konnte gezeigt werde, dass eine 24-stündige in vitro Exposition von Alveolarmakrophagen unter normobarer Hyperoxie die Aktivität der Atmungskette beeinträchtigt.

Im Protokoll „Standard“ fiel eine Verringerung der Maximalkapazität (Entkopplungsstadium E) der Atmungskette auf. Ein Einfluss von Temperatur und Oligomycin konnte dabei durch Kontrollen ausgeschlossen werden.
Die Tatsache der verringerten Maximalkapazität wurde dann in den Complex-Protokollen sowohl in gekoppeltem Zustand (Stadium 3 nach ADP) als auch in entkoppeltem Zustand (Stadium E) verifiziert und genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Atmungskette nicht gleichermaßen an allen Bestandteilen in ihrer Aktivität gemindert wurde. Es wurde dabei eine signifikante Beeinträchtigung der Aktivität von Komplex II gefunden, während die anderen Komplexe zwar leichte, aber keine signifikanten Beeinträchtigungen zeigten.

Schließlich wirkt sich der Schaden der Atmungskette auch auf den Kopplungszustand des Elektronentransportsystems an die oxidative Phosphorylierung aus. Dabei kommt es nach Hyperoxie zu einer Abnahme des Kopplungsgrades was sich durch die P/E-Ratio zeigte.

### 4.5.2 Ausblick

In der Arbeit wurde ausschließlich eine 24-stündige Hyperoxie auf Alveolarmakrophagen einer in vitro Zellkulturreihe untersucht.

Es würde sich anbieten, in zukünftigen Arbeiten das Studienmodell zu ändern. Dabei könnte man verschiedene Expositionsdauern, wie 12, 24 und 48 Stunden und eventuelle Zwischenschritte anwenden, um die toxische Grenze zu ermitteln und einen Eindruck über die Regeneration der Zelle zu gewinnen.
Weiterhin könnte man auch die Sauerstoffkonzentration verändern, um bei konstanter Expositionsdauer die toxische Grenze einer steigenden Sauerstoffkonzentration zu ermitteln. So scheint eine 95% Sauerstoffatmosphäre sehr toxisch zu sein. Man könnte in 10% Schritten diese Konzentration verringern (80%, 70%, 60%, etc.) um verschiedene Grade der Toxizität aufzuzeigen und gegeneinander zu vergleichen.
Durch Veränderung der Protokolle könnte man Fehlerquellen beseitigen. So könnte man statt Saponin nur noch Digitonin verwenden, da die Auswirkung von Saponin schlecht abschätzbar war. Man musste Saponin titrieren bis es zu einem Abfall des Sauerstoffverbrauchs kam. Das Vorgehen mit festen Digitoninkonzentrationen ist mit standardisiert. Interessant wäre hierbei auch eine Wiederholung des Cytochrom C Tests mit Digitonin im Protokoll „Complex-entkoppelt“.

Natürlich wäre es auch wichtig, im Protokoll „Complex-ADP“ höhere Fallzahlen zu erreichen. In unseren Protokollen wurden Fallzahlen n=7 bzw. im Protokoll „Complex-ADP“ nur n=4 erreicht. Für die Power der Untersuchung wäre es deshalb wichtig, größere Fallzahlen zu erreichen.

Schließlich wäre es auch interessant, wie sich eine normobare Hyperoxie auf andere Zelltypen, wie beispielsweise periphere Makrophagen (RAW-Zelllinie) auswirkt und vor allem auch in vivo auf die Physiologie und Funktionalität der Zelle in ihrem natürlichen Umfeld.

# 5. Zusammenfassung

Sauerstoff ist in der Medizin nicht wegzudenken. Die Verwendung ist inzwischen jedoch deutlich restriktiver geworden. In vorrangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Sauerstoffradikale toxisch auf die Zelle wirken. Häufig wurde dabei die Zelle isoliert und außerhalb ihrer Physiologie untersucht. Die vorliegende Untersuchung sollte deshalb an der intakten Zelle die Auswirkung von normobarer Hyperoxie klären. Die Funktion der Atmungskette wurde als Parameter gewählt, da dort viel Sauerstoffmetabolismus herrscht und freie Radikale entstehen. Sauerstofftoxizität sollte dort deshalb besonders gut darstellbar sein.

Zur Untersuchung der Auswirkung wurde ein hochauflösendes Respirometer verwendet. Damit war die Darstellung des Sauerstoffmetabolismus nahe an der Physiologie der Zelle möglich. Gezeigt werden sollte damit, ob eine normobare Hyperoxie von 24h die Aktivität der Atmungskette beeinflusst und es dabei zu einer gleichmäßigen Beeinflussung kommt oder ob verschiedene Komplexe stärker beeinträchtigt werden. Außerdem sollte geklärt werden, ob die Kopplung der Atmungskette an die Oxidative Phosphorylierung beeinflusst wird.

Als Zellmodell wurden Alveolarmakrophagen gewählt, die in 95% Sauerstoffatmosphäre inkubiert wurden. Diese wurden mit Zellen derselben Zellreihe und Passage verglichen, welche wiederum in Raumluft inkubiert wurden.

Die Untersuchung kommt zu dem Ergebnis, dass normobare Hyperoxie eine schädliche Auswirkung auf die mitochondriale Atmung der Alveolarmakrophagen hat. Die Exposition über 24 Stunden zeigte unter Sauerstoffexposition diverse Veränderungen. So konnte festgestellt werden, dass Sauerstoff die maximale Kapazität des Elektronen Transport Systems verringert, die Integrität der Zelle beschädigt und vor allem die Aktivität von Komplex II vermindert. Desweiteren kam es zu einer Beeinträchtigung der Kopplung des Elektronen Transport Systems an die oxidative Phosphorylierung.

Die Studie konnte damit zeigen, dass normobare Hyperoxie von 24 Stunden Schäden an den Enzymen der Atmungskette von Alveolarmakrophagen verursacht und sie damit in ihrer Physiologie gestört werden. Diese Informationen könnten dem weiteren Verständnis von molekularen Mechanismen der zellulären Physiologie im Rahmen von Sauerstofftoxizität helfen.

# 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] Allen CB and White CW: Glucose modulates cell death due to normobaric hyperoxia by maintaining cellular ATP. *The American journal of physiology* 274: L159–164 (1998).

[4] Balan IS, Fiskum G, Hazelton J, Cotto-Cumba C and Rosenthal RE: Oximetry-guided reoxygenation improves neurological outcome after experimental cardiac arrest. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 37: 3008–3013 (2006).

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

[6] Barker S, Weinfeld M and Murray D: DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutation research* 589: 111–135 (2005).

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

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

[9] Boveris A and Chance B: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* 134: 707–716 (1973).

[10] Brand MD, Chien LF, Ainscow EK, Rolfe DF and Porter RK: The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochimica et biophysica acta* 1187: 132–139 (1994).

[11] Brand MD and Nicholls DG: Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal* 435: 297–312 (2011).

[12] Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW and Sheu S-S: Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology. Cell physiology* 287: C817–833 (2004).

[13] Brooks GA, Hittelman KJ, Faulkner JA and Beyer RE: Temperature, skeletal muscle mitochondrial functions, and oxygen debt. *The American journal of physiology* 220: 1053–1059 (1971).

[14] Calzia E, Asfar P, Hauser B, Matejovic M, Ballestra C, Radermacher P and Georgieff M: Hyperoxia may be beneficial. *Critical care medicine* 38: 559–568 (2010).

[15] 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).

[16] Carraway MS and Piantadosi CA: Oxygen toxicity. *Respiratory care clinics of North America* 5: 265–295 (1999).

[17] Ceriello A: Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress. *International journal of clinical practice. Supplement* 51–58 (2002).

[18] Chance B and Williams GR: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *The Journal of biological chemistry* 217: 383–393 (1955).

[19] Choi J, Roche H and Caquet T: Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in Chironomus riparius Mg. (Diptera: Chironomidae) larvae. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP* 130: 11–17 (2001).

[20] Cohen PJ: The metabolic function of oxygen and biochemical lesions of hypoxia. *Anesthesiology* 37: 148–177 (1972).

[21] Comroe JH J: Oxygen toxicity: The effect of inhalation of high concentrations of oxygen for twenty-four hours on normal men at sea level and at a simulated altitude of 18,000 feet. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 128: 710–717 (1945).

[22] Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M and Lunec J: Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17: 1195–1214 (2003).

[23] Cooke MS, Olinski R and Evans MD: Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clinica Chimica Acta* 365: 30–49 (2006).

[24] Das KC: Hyperoxia decreases glycolytic capacity, glycolytic reserve and oxidative phosphorylation in MLE-12 cells and inhibits complex I and II function, but not complex IV in isolated mouse lung mitochondria. *PloS one* 8: e73358 (2013).

[25] de Jonge E, Peelen L, Keijzers PJ, Joore H, de Lange D, van der Voort PHJ, Bosman RJ, de Waal RAL, Wesselink R and de Keizer NF: Association between administered oxygen, arterial partial oxygen pressure and mortality in mechanically ventilated intensive care unit patients. *Critical care (London, England)* 12: R156 (2008).

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

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

[28] Dunham CM, Barraco RD, Clark DE, Daley BJ, Davis FE 3rd, Gibbs MA, Knuth T, Letarte PB, Luchette FA, Omert L, Weireter LJ and Wiles CE 3rd: Guidelines for emergency tracheal intubation immediately after traumatic injury. *The Journal of trauma* 55: 162–179 (2003).

[29] Eigentler A, Fontana-Ayoub M and Fasching M: Selected Media and Chemicals for Respirometry with Mitochondria and Permeabilized Cells. *Mitochondrial Physiology Network 03.02* 9: 1–9 (2012).

[30] 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).

[31] Forman HJ and Torres M: Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB life* 51: 365–371 (2001).

[32] Garedew A, Lemieux H, Schachner T, Blier PU, Tardif J-C GE: Temperature effects on the control and capacity of mitochondrial respiration in permeabilized fibers of the mouse heart. *Biochim. Biophys. Acta, EBEC Short Reports Suppl* 14: 167–168 (2006).

[33] Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P and Fenn WO: Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science of Aging Knowledge Environment* 2005: cp1 (2005).

[34] 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).

[35] Gille JJP and Joenje H: Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutation Research/DNAging* 275: 405–414 (1992).

[36] Gnaiger E: Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41: 1837–1845 (2009).

[37] Gnaiger E: High-Resolution Respirometry The Oxygraph for High-Resolution Respirometry. *Mitochondr Physiol Network* 6.1: 1–19 (2007).

[38] Gnaiger E: Isolated Mitochondria or Permeabilized Tissues and Cells. *Mitochondrial Physiology Network* 5: 1–5 (2011).

[39] Gnaiger E: Mitochondrial pathways and respiratory control. *OROBOROS MiPNet Publications* 96 pp.: (2007).

[40] Gnaiger E: Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. An Introduction to OXPHOS Analysis. *Mitochondr Physiol Network 17.18.* 64: (2012).

[41] Gnaiger E: MitoPathways: Respiratory States and Coupling Control Ratios. *Mitochondr Physiol Network 12* 43–53 (2011).

[42] Gnaiger E: Oxygen conformance of cellular respiration. A perspective of mitochondrial physiology. *Advances in experimental medicine and biology* 543: 39–55 (2003).

[43] Gnaiger E: Oxygen Solubility in Experimental Media. *Mitochondr Physiol Network* 6: 1–6 (2008).

[44] Gnaiger E: Polarographic Oxygen Sensors, The Oxygraph, And High-Resolution Respirometry To Asses Mitochondrial Function. *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*. D. James and W. Yvonne, eds. John Wiley and Sons. 327–352 (2008).

[45] Gnaiger E and Kuznetsov AV: Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochemical Society transactions* 30: 252–258 (2002).

[46] Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI and Green DR: The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature cell biology* 2: 156–162 (2000).

[47] Gwinn MR and Vallyathan V: Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* 9: 27–39 (2006).

[48] 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).

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

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

[51] Halliwell B and Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press (1999).

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

[53] 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).

[54] Hirano S: Nitric oxide-mediated cytotoxic effects of alveolar macrophages on transformed lung epithelial cells are independent of the beta 2 integrin-mediated intercellular adhesion. *Immunology* 93: 102–108 (1998).

[55] 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, the German Society fo. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 63: e1–68 (2009).

[56] Hogg N and Kalyanaraman B: Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411: 378–384 (1999).

[57] Hou L, Xie K, Li N, Qin M, Lu Y, Ma S, Ji G and Xiong L: 100% oxygen inhalation protects against zymosan-induced sterile sepsis in mice: the roles of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes. *Shock (Augusta, Ga.)* 32: 451–461 (2009).

[58] Huang Y, Rabb H and Womer KL: Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses. *Cellular immunology* 248: 4–11 (2007).

[59] Hütter E, Unterluggauer H, Garedew A, Jansen-Dürr P and Gnaiger E: High-resolution respirometry--a modern tool in aging research. *Experimental gerontology* 41: 103–109 (2006).

[60] Iles KE and Forman HJ: Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunologic research* 26: 95–105 (2002).

[61] Jaeschke H: Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 284: G15–26 (2003).

[62] 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).

[63] Julian D, April KL, Patel S, Stein JR and Wohlgemuth SE: Mitochondrial depolarization following hydrogen sulfide exposure in erythrocytes from a sulfide-tolerant marine invertebrate. *The Journal of experimental biology* 208: 4109–4122 (2005).

[64] Kehrer JP: The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149: 43–50 (2000).

[65] Kelly OM, McNamara YM, Manzke LH, Meegan MJ and Porter RK: The preservation of in vivo phosphorylated and activated uncoupling protein 3 (UCP3) in isolated skeletal muscle mitochondria following administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA aka ecstasy) to rats/mice. *Mitochondrion* 12: 110–119 (2012).

[66] 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).

[67] 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* 212: 38–46 (2007).

[68] Koßobutzki C: Die Geschichte der inhalativen Sauerstofftherapie in Deutschland. (2008).

[69] Kuznetsov AV, Brandacher G, Steurer W, Margreiter R and Gnaiger E: Estimation of mitochondrial damage in heart preservation. *Transplantation proceedings* 31: 992 (1999).

[70] Kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R, Brandacher G, Mark W, Steurer W, Saks V, Usson Y, Margreiter R and Gnaiger E: Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 286: H1633–1641 (2004).

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

[72] Leigh JM: Early treatment with oxygen. *Anaesthesia* 29: 194–208 (1974).

[73] Leverve XM: To cope with oxygen: a long and still tumultuous story for life. *Critical care medicine* 36: 637–638 (2008).

[74] Lindahl SGE: Oxygen and life on earth: an anesthesiologist's views on oxygen evolution, discovery, sensing, and utilization. *Anesthesiology* 109: 7–13 (2008).

[75] Liu Y, Fiskum G and Schubert D: Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry* 80: 780–787 (2002).

[76] Loschen G, Flohé L and Chance B: Respiratory chain linked H2O2 production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Letters* 18: 261–264 (1971).

[77] Martinou J-C and Youle RJ: Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental cell* 21: 92–101 (2011).

[78] McCord JM: The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine* 108: 652–659 (2000).

[79] Moradkhan R and Sinoway LI: Revisiting the Role of Oxygen Therapy in Cardiac Patients. *Journal of the American College of Cardiology* 56: 1013–1016 (2010).

[80] Nabben M, Shabalina IG, Moonen-Kornips E, van Beurden D, Cannon B, Schrauwen P, Nedergaard J and Hoeks J: Uncoupled respiration, ROS production, acute lipotoxicity and oxidative damage in isolated skeletal muscle mitochondria from UCP3-ablated mice. *Biochimica et biophysica acta* 1807: 1095–1105 (2011).

[81] Nagato AC, Bezerra FS, Lanzetti M, Lopes AA, Silva MAS, Porto LC and Valenca SS: Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. *International Journal of Experimental Pathology* 93: 269–278 (2012).

[82] Nyunoya T, Powers LS, Yarovinsky TO, Butler NS, Monick MM and Hunninghake GW: Hyperoxia Induces Macrophage Cell Cycle Arrest by Adhesion-dependent Induction of p21Cip1 and Activation of the Retinoblastoma Protein. *Journal of Biological Chemistry* 278: 36099–36106 (2003).

[83] O'Driscoll BR, Howard LS and Davison AG: BTS guideline for emergency oxygen use in adult patients. *Thorax* 63 Suppl 6: vi1–68 (2008).

[84] O'Reilly P and Bailey W: Long-term continuous oxygen treatment in chronic obstructive pulmonary disease: proper use, benefits and unresolved issues. *Current opinion in pulmonary medicine* 13: 120–124 (2007).

[85] Ott M, Gogvadze V, Orrenius S and Zhivotovsky B: Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12: 913–922 (2007).

[86] Rahman I: Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *Journal of biochemistry and molecular biology* 36: 95–109 (2003).

[87] Rolfe DF, Newman JM, Buckingham JA, Clark MG and Brand MD: Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *The American journal of physiology* 276: C692–699 (1999).

[88] Sackner MA, Landa J, Hirsch J and Zapata A: Pulmonary effects of oxygen breathing. A 6-hour study in normal men. *Annals of internal medicine* 82: 40–43 (1975).

[89] Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, Tranqui L, Olivares J, Winkler K, Wiedemann F and Kunz WS: Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Molecular and cellular biochemistry* 184: 81–100 (1998).

[90] Sammut IA, Thorniley MS, Simpkin S, Fuller BJ, Bates TE and Green CJ: Impairment of hepatic mitochondrial respiratory function following storage and orthotopic transplantation of rat livers. *Cryobiology* 36: 49–60 (1998).

[91] Scatena R, Messana I, Martorana GE, Gozzo ML, Lippa S, Maccaglia A, Bottoni P, Vincenzoni F, Nocca G, Castagnola M and Giardina B: Mitochondrial damage and metabolic compensatory mechanisms induced by hyperoxia in the U-937 cell line. *Journal of biochemistry and molecular biology* 37: 454–459 (2004).

[92] Schneeberger S, Kuznetsov AV, Seiler R, Renz O, Meusburger H, Mark W, Brandacher G, Margreiter R and Gnaiger E: Mitochondrial ischemia-reperfusion injury of the transplanted rat heart: improved protection by preservation versus cardioplegic solutions. *Shock (Augusta, Ga.)* 30: 365–371 (2008).

[93] Schoonen WG, Wanamarta AH, van der Klei-van Moorsel JM, Jakobs C and Joenje H: Respiratory failure and stimulation of glycolysis in Chinese hamster ovary cells exposed to normobaric hyperoxia. *The Journal of biological chemistry* 265: 1118–1124 (1990).

[94] Sepehr R, Audi S, Staniszewski K, Haworth S, Jacobs E and Ranji M: Novel Flurometric Tool to Assess Mitochondrial Redox State of Isolated Perfused Rat Lungs after Exposure to Hyperoxia. *IEEE Journal of Translational Engineering in Health and Medicine* 000055: 1–1 (2013).

[95] Shringarpure R and Davies KJA: Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free radical biology & medicine* 32: 1084–1089 (2002).

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

[97] Sies H: Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry / FEBS* 215: 213–219 (1993).

[98] Stadlmann S, Rieger G, Amberger A, Kuznetsov AV, Margreiter R and Gnaiger E: H2O2-mediated oxidative stress versus cold ischemia-reperfusion: mitochondrial respiratory defects in cultured human endothelial cells. *Transplantation* 74: 1800–1803 (2002).

[99] Steinlechner-Maran R, Eberl T, Kunc M, Margreiter R and Gnaiger E: Oxygen dependence of respiration in coupled and uncoupled endothelial cells. *The American journal of physiology* 271: C2053–2061 (1996).

[100] Strätling M and Schmucker P: 100 Jahre Sauerstofftherapie (1902 - 2002) - Eine medizinhistorische Neubewertung. *ains · Anästhesiologie · Intensivmedizin · Notfallmedizin · Schmerztherapie* 37: 712–720 (2002).

[101] Strober W: Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* Appendix 3: Appendix 3B (2001).

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

[103] Toyokuni S: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology international* 49: 91–102 (1999).

[104] Turrens JF: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552: 335–344 (2003).

[105] Valenca SS, Nagato AC, Bezerra FS, Lopes AA, Santos T, Lanzetti M and Porto LC: Hyperoxia-induced a time-dependent lung oxidative stress in BALB/c mice. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23: (2009).

[106] von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E and Newmeyer DD: Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *The Journal of cell biology* 150: 1027–1036 (2000).

[107] Waterhouse NJ, Goldstein JC, von Ahsen O, Schuler M, Newmeyer DD and Green DR: Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *The Journal of cell biology* 153: 319–328 (2001).

[108] Windisch W, Brambring J, Budweiser S, Dellweg D, Geiseler J, Gerhard F, Köhnlein T, Mellies U, Schönhofer B, Schucher B, Siemon K, S.Walterspacher, M.Winterholler and Sitter H: Nichtinvasive und invasive Beatmung als Therapie der chronischen respiratorischen Insuffizienz. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 64: 207–240 (2010).

[109] 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).

# Anhang

## *Lebenslauf*

| | |
|---|---|
| Name | Ulf Bastian Bock |
| Eltern | Irmtraud Müller, Sozialpädagogin<br>Walter Bock, Betriebswirt |
| Geburtstag | 04.05.1986 |
| Geburtsort | Stuttgart |
| Nationalität | deutsch |
| Familienstand | ledig |

### Studium

| | |
|---|---|
| 11/2014 | Staatsexamen |
| 10/2008 – 11/2014 | Studium Humanmedizin Universität Ulm |

*Praktisches Jahr und Famulaturen*

| | | |
|---|---|---|
| 04/2014 – 07/2014 | 3. PJ-Tertial: Anästhesie | Universitätsklinikum Ulm |
| 12/2013 – 04/2014 | 2. PJ-Tertial: Chirurgie | King Edward VIII Hospital, Durban, Südafrika |
| 08/2013 – 12/2013 | 1. PJ-Tertial: Innere Medizin | Royal University Hospital Liverpool, UK |
| | | |
| 18.10.2012 – 18.11.2012 | Pädiatrie | KH Memmingen |
| 12.08.2012 – 09.09.2012 | Notaufnahme und HNO | Shaare Zedek Medical Center, Jerusalem, Israel |
| 27.02.2012 – 25.03.2012 | Gynäkologie | KH Memmingen |
| 01.09.2011 – 30.09.2011 | Anästhesie | KH Ludwigsburg |
| 23.03.2011 – 10.04.2011 | Neurologie | RKU Ulm |

*Studentische Lehrtätigkeit*

| | | |
|---|---|---|
| 04/2011 – 07/2014 | Tutor im Kurs: “Notfallmedizin” | Dr. Dr. Dirks und Prof. Dr. Muth |
| 04/2011 – 07/2014 | Tutor im Kurs:<br>“POL - Einführung in klinische Medizin” | Dipl.-Päd. Grab,<br>Studiendekanat |
| 09/2010 – 02/2012 | Tutor im Kurs: “Anatomie im Bild” | Dr. Fassnacht |
| 09/2010 – 02/2011 | Tutor im Kurs: “Makroskopische Anatomie“ | Prof. Dr. Böckers |

### Berufsausbildung

| | |
|---|---|
| Seit 02/2015 | Facharztausbildung Anästhesie, Universitätsklinikum Ulm |
| 05/2008 – 10/2008 | Tätigkeit als Rettungsassistent, Rettungsdienst DRK Ulm |
| 10/2006 – 04/2008 | Berufsausbildung zum Rettungsassistent, Rettungsdienst DRK Ulm |
| 08/2005 – 07/2006 | FSJ, Rettungsdienst DRK Ludwigsburg |

### Schulbildung

| | |
|---|---|
| 1996 – 2005 | Gymnasium Korntal-Münchingen |
| 1992 – 1996 | Grundschule Teichwiesenschule Korntal-Münchingen |

Ulm, 28.06.2015