

Klinik für Anästhesiologie Universitätsklinikum Ulm

Leiter: Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. M. Georgieff

Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung

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

**Effekte einer intermittierenden Hyperoxie auf die
mitochondriale Atmung in Alveolarmakrophagen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von:

Christine Barth

Geburtsort: Ulm

vorgelegt im Jahr 2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Enrico Calzia

2. Berichterstatter: PD Dr. Andrea Formentini

Tag der Promotion: 17.06.2016

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG	- 1 -
1.1. KONTROVERSE DES SAUERSTOFFES IN DER MEDIZIN	- 1 -
1.2. QUELLEN DER SAUERSTOFFRADIKALE	- 2 -
1.3. AUSWIRKUNG DER MITOCHONDRIALEN ROS BILDUNG AUF DIE ZELLE	- 3 -
1.4. EFFEKTE DER ROS AUF DIE MITOCHONDRIEN	- 4 -
1.4.1. <i>ROS induzierte Schädigung der mitochondrialen DNA</i>	- 5 -
1.4.2. <i>ROS induzierte Schädigung der mitochondrialen Membranbestandteile: Phospholipide und Proteine</i>	- 5 -
1.5. ABWEHRMECHANISMEN DER ZELLE GEGEN ROS	- 7 -
1.6. HYPEROXIE – DEFINITION	- 8 -
1.7. HYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG DER STUDIE	- 10 -
2. MATERIAL UND METHODEN	- 12 -
2.1. STUDIENAUFBAU	- 12 -
2.2. VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN	- 13 -
2.2.1. <i>Laborgeräte</i>	- 13 -
2.2.2. <i>Chemikalien, Reagenzien</i>	- 14 -
2.2.3. <i>Zellkulturen, Zellmedium</i>	- 15 -
2.2.4. <i>Software</i>	- 15 -
2.3. METHODEN	- 16 -
2.3.1. <i>Zellkulturen – Anlage und Aufbereitung</i>	- 16 -
2.3.2. <i>Hyperoxygenierung der Zellkultur</i>	- 16 -
2.3.3. <i>Vorbereitung der Zellkulturen</i>	- 17 -
2.3.4. <i>High Resolution Respirometrie – das Messprinzip</i>	- 18 -
2.3.4.1. <i>Aufbau des Oxygraphen – Prinzip der Sauerstoffmessung</i>	- 19 -
2.3.5. <i>Zellzählung</i>	- 20 -
2.3.6. <i>Respirometrische Messung - ein Überblick über den gesamten Versuchsablauf</i>	- 21 -
2.3.7. <i>Mitochondriale Respirationsstadien nach Nicholls und Ferguson</i>	- 22 -
2.3.8. <i>Respirometrische Messung – Erreichen der OXPHOS Kapazität</i>	- 23 -
2.3.9. <i>Respirometrische Messung – Komplex IV Aktivität und Autooxidation</i>	- 34 -
2.3.9.1. <i>Berechnung der Komplex IV Aktivität unter Berücksichtigung der Autooxidation</i>	- 34 -
2.3.10. <i>Auswertung und Berechnungen der Versuchsergebnisse</i>	- 36 -

2.3.10.1. Berechnung der relativen OXPHOS – Kapazität (OXPHOS%)	- 37 -
2.3.10.2. Berechnung der Respiratorischen Control Ratio, RCR	- 37 -
2.3.11. <i>Statistische Analyse</i>	- 38 -
3. ERGEBNISSE	- 39 -
3.1. KOMPLEX I	- 39 -
3.2. OXPHOS	- 41 -
3.3. KOMPLEX II	- 42 -
3.4. KOMPLEX I + II	- 43 -
3.5. KOMPLEX IV	- 45 -
3.6. RELATIVE OXPHOS – KAPAZITÄT (OXPHOS %)	- 46 -
3.7. RESPIRATORISCHE CONTROL RATIO (RCR)	- 47 -
3.8. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	- 48 -
4. DISKUSSION	- 49 -
4.1. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	- 49 -
4.1.1. <i>Diskussion der beiden Fragestellungen</i>	- 49 -
4.1.2. <i>Diskussion der weiteführenden spezifischen Fragestellungen</i>	- 50 -
4.2. DISKUSSION DER METHODE	- 51 -
4.3. SCHLUSSFOLGERUNG:	- 53 -
5. ZUSAMMENFASSUNG	- 55 -
6. LITERATURVERZEICHNIS	- 57 -

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AA	Antimycin A
ADP	Adenosindiphosphat
Asc	Ascorbat
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytochrom C
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cyt C	Cytochrom C
Dig	Digitonin
DNA	"desoxyribonucleic acid" englisch / Desoxyribonukleinsäure
e ⁻	Elektron
ETS	Elektronentransfersystem
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid - oxidiert
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid - reduziert
Glu	Glutamat
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ⁺	Proton
I	Komplex I

II	Komplex II
III	Komplex III
IV	Komplex IV
Mal	Malat
min	Minuten
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mt DNA	"mitochondrial desoxynucleic acid" (englisch) mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
Na ₂ S	Natriumsulfid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid - reduziert
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid - oxidiert
NO	Stickstoffmonooxid
o.g.	oben genannt
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxidanion
OH ⁻	Hydroxylanion
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
OXPHOS %	relative oxidative Phosphorylierungskapazität
Pi	organisches Phosphat
Pyr	Pyruvat
Q	Q-Zyklus
rcf	"relative centrifugal force" englisch / relative Zentifugalkraft
RCR	"respiratory control ratio" englisch/ respiratorisches Kontrollverhältnis
ROS	"reactive oxygen species" englisch/ Reaktive Sauerstoffspezies

Rot	Rotenon
rpm	"rounds per minute" englisch / Umdrehungen pro Minute
s.o.	siehe oben
sec	Sekunden
SIRT 3	NAD ⁺ dependent deacetylase sirtuin 3
SOD	Superoxiddismutase
SOD1	Superoxiddismutase 1 (zytoplasmatisch)
sog.	sogenannt
Succ	Succinat
TMPD	Tetramethylphenylendiamin
u.a.	und andere

1. Einleitung

1.1. Kontroverse des Sauerstoffes in der Medizin

Die mechanische Ventilation mit hohen Sauerstoffkonzentrationen ist in der praktischen Medizin für Patienten mit Schwierigkeiten in der Aufrechterhaltung einer adäquaten Oxygenierung unabdingbar [58]. Seit über 200 Jahren wird Sauerstoff zu therapeutischen Zwecken eingesetzt [33]. Ein Beispiel für die Gabe von Sauerstoff mit dem Empfehlungsgrad A ist, in der Notfallmedizin die innerklinische Reanimation [11]. Des Weiteren wird die Sauerstoffgabe mit dem Empfehlungsgrad A bei hospitalisierte Patienten mit Pneumonie und begleitender Hypoxämie [27] sowie bei Patienten mit einer chronisch respiratorischen Insuffizienz mit anhaltender Sauerstoffsättigung unter 90 %, im Rahmen verschiedener Grunderkrankungen empfohlen. Hier spielt die Sauerstofftherapie bei der Behandlung der COPD (chronisch obstructive pulmonary disease) eine sehr wichtige Rolle [37]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Beatmung mit 100 Prozent Sauerstoff bei Sepsis die Organfunktionen verbessert [4].

Es wird jedoch im Rahmen der modernen Medizin immer mehr auf die mögliche schädigende Wirkung des Sauerstoffes geachtet und eingegangen, da es bei anhaltender Exposition gegenüber hyperoxygene Bedingungen zur massiven Bildung hochreaktiver Sauerstoffradikale kommt. Diese können in potentiell jedem Organ oxidative Schäden anrichten [58].

1.2. Quellen der Sauerstoffradikale

Gerschman postulierte 1964 erstmals, dass Sauerstoff eine toxische Wirkung auf Zellen und die darin enthaltenen Mitochondrien hat. Sie führte dies auf die Bildung von freien Sauerstoffradikalen zurück, die zu oxidativen Schäden in Zellen führen. Weiterhin fand sie heraus, dass Sauerstoff ab einer Konzentration von über 20 Prozent potenziell toxisch wirkt und sie spekulierte, dass ein Anstieg der Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre Abwehrmechanismen in der Zelle gegen freie Radikale bewirkt [14, 15]. Mitochondrien selbst sind ein wichtiger Bildungsort von freien Radikalen, den sogenannten ROS (reaktive oxygen species). Zu diesen ROS zählen unter anderem das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}). Sie haben die gemeinsame Eigenschaft einer hohen Reagibilität, wobei das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) die höchste aufweist [31, 54]. Werden mehr Sauerstoffradikale produziert als abgebaut, spricht man vom sogenannten „oxidativem Stress“ für die Zelle [41].

Die ersten Berichte darüber, dass in der Atmungskette ROS entstehen, erschienen 1966 von Chance und seinen Kollegen, die zeigen konnten, dass isolierte Mitochondrien H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) produzieren [9]. Später wurde dann herausgefunden, dass H_2O_2 bei der Dismutation von Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) in Mitochondrien entsteht. Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym ist die mitochondriale Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD). Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), das Substrat dieses Enzyms, entsteht durch die Reduktion von Sauerstoff in den Mitochondrien. Für die Reduktion von molekularem Sauerstoff sind vor allem redoxaktive prosthetische Gruppen von Proteine verantwortlich. Zudem spielen elektronenübertragende Coenzyme eine wichtige Rolle bei der Reduktion. [40, 57].

Die Produktion von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist von zwei Faktoren abhängig: zum einen von den gerade genannten reduzierenden Elektronendonatoren und zum anderen von der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration. Wenn die in vitro vorherrschende Sauerstoffkonzentration über 21 Prozent liegt, steigt die Superoxidanion($O_2^{\cdot-}$)-bildung mit der zunehmenden Sauerstoffkonzentration nahezu proportional an [40].

Hauptquelle der Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$)-bildung ist der Komplex I [5, 34]. Hier spielt das NADH/NAD⁺ Verhältnis eine tragende Rolle. Die Hemmung der Atmungskette durch Schädigung, Mutationen, Ischämie, Cytochrom C Verlust oder auf Grund eines physiologischen NADH-Anstieges bei verringertem ATP Bedarf führt zu einer geringen Respirationsrate.

Diese geringe respiratorische Aktivität bringt nun ein erhöhtes Verhältnis von NADH zu NAD⁺ mit sich, was in eine erhöhte Superoxidanion (O₂^{•-})-Bildung durch Reduktion von molekularem Sauerstoff mündet. Im Vergleich dazu werden bei intakten Mitochondrien, mit normaler Aktivität der Atmungskette und damit einer geringen NADH Konzentration, nur geringe Superoxidanion (O₂^{•-}) mengen durch den Komplex I produziert [5, 40, 52]. Die Produktion von ROS durch den Komplex III ist in vitro vernachlässigbar gering, dies konnte durch eine Vielzahl an Studien gezeigt werden [26]. Andere Studien hingegen postulieren, dass 70-80% der mitochondrialen O₂^{•-} Bildung aus dem Q Zyklus (Ubihydrochinon [QH₂] wird zu Ubichinon [Q] oxidiert) entstehen. Wobei der Q-Zyklus einen Bestandteil des Cytochrom C katalysierten Elektronentransfersystemes des Komplexes III darstellt [9, 25]. Zudem gibt es durchaus weitere mitochondriale Enzyme wie die α-Ketoglutarat - Dehydrogenase oder die Coenzym Q - Reduktase, die an der ROS Bildung in den Mitochondrien beteiligt sind. Deren quantitativer Anteil an der ROS Bildung unterschreitet jedoch den Anteil des Komplexes I deutlich. [12, 40].

1.3. Auswirkung der mitochondrialen ROS Bildung auf die Zelle

ROS stellen zum einen äußerst wichtige Modulatoren der Zellfunktion dar: in niedrigen Konzentrationen sind sie essentielle Bestandteile der Signalwege der Zellen. Während sie zum anderen in hohen Konzentrationen die normale Zellfunktion stören und zu Schäden in Lipiden, Nucleinsäuren und Proteinen der Zelle führen [12, 25, 39]. Abbildung 1 zeigt schematisch einen Überblick über die Folgen der mitochondrialen ROS Bildung auf den Organismus. Die ROS Produktion führt zu oxidativen Schäden in mitochondrialen Proteinen, Lipidmembranen und DNA. Damit wird die respiratorische Aktivität der Mitochondrien beeinträchtigt. Die ATP-Synthese nimmt ab. Der oxidative Membranschaden führt des Weiteren dazu, dass Proteine, die normalerweise im Intermembranraum lokalisiert sind, wie zum Beispiel das Cytochrom C, in das Zytosol der Zelle gelangen und hier die Apoptose der Zelle einleiten. Dieser Zelluntergang mündet dann in Krankheit und Alterung des Organismus [40].

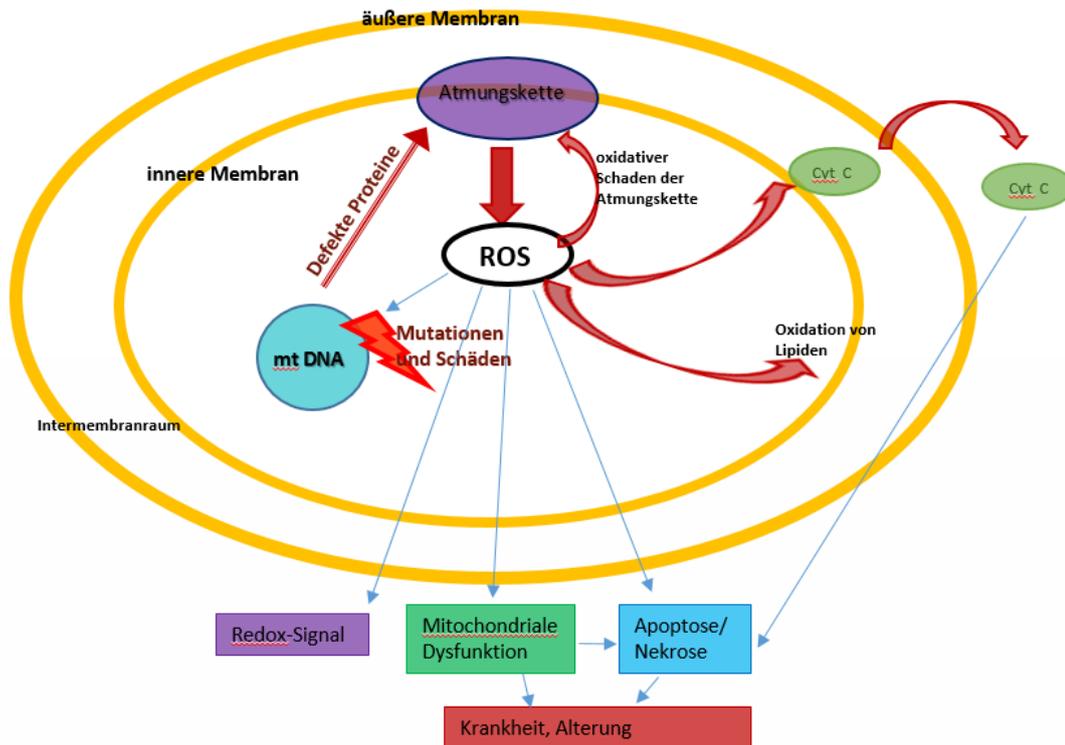


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Mitochondriums mit ROS Bildung und deren Folgen für die Zelle und den Organismus. Die Idee für diese Abbildung stammt aus: [40]

mt DNA: mitochondriale Desoxyribonucleinsäure, ROS "reactive oxygen species" englisch/ Reaktive Sauerstoffspezies, Cyt c: Cytochrom C

Die Oxidation von Lipiden durch Radikale findet vor allem an mehrfach ungesättigten Fettsäuren von Zellmembranen statt. Diese sogenannte Lipidperoxidation wird gern bei hohen Konzentration an Sauerstoffradikalen getriggert, die mit den mehrfach ungesättigten Membranfettsäuren wie der Arachidonsäure, der Linolsäure, der Eikosanoinsäure oder der Docosanoinsäure reagieren. Das führt zur Zerstörung der Integrität der Phospholipid-Doppelschicht zellulärer Membranen. Aber auch die in den Membranen lokalisierten Proteine werden durch Radikale in ihrer Integrität und Funktion gestört. Durch Radikale kommt es zur Carbonylierung, Nitrierung und Alkylierung der Proteine, welche dadurch ihre Tertiärstruktur verlieren, was zum besagten Integritäts- und Funktionsverlust führt [24].

1.4. Effekte der ROS auf die Mitochondrien

Mitochondrien wurden in einigen Studien als eine wichtige Quelle von ROS, aber auch als ein kritisches Ziel dieser Radikale identifiziert. [24, 44].

Studien belegen, dass die Störung der respiratorischen Funktion von Mitochondrien mit einem Anstieg der mitochondrialen Produktion von freien Radikalen und der daraus resultierenden Lipidperoxidation einhergeht [3]

Vor allem das Hydroxylradikal (OH^\cdot), das aus Wasserstoffperoxid entstehen kann, wurde als das schädlichste Radikal für die mitochondrialen Biomoleküle identifiziert.

Durch oxidativen Stress werden insbesondere mitochondriale Proteine, die mitochondriale DNA und die in der Mitochondrienmembranen enthaltenen Lipide geschädigt.

1.4.1. ROS induzierte Schädigung der mitochondrialen DNA

Die oxidative Schädigung der mitochondrialen DNA führt zu DNA-Strangbrüchen und damit einhergehenden Mutationen im mitochondrialen Genom, welches auch für Proteine der Komplexe I, III und IV der Atmungskette kodiert. Diese Prozesse bringen eine Verminderung der Atmungskettenaktivität mit sich, was wiederum zu einer erhöhten Produktion von ROS in den Mitochondrien führt. Dieser Circulus vitiosus führt also in eine immer weiter voranschreitende Abnahme der mitochondrialen Funktion bei oxidativem Stress [44].

1.4.2. ROS induzierte Schädigung der mitochondrialen Membranbestandteile: Phospholipide und Proteine

Die Peroxidation von Phospholipiden durch Radikale wird als eine der Hauptursachen der mitochondrialen Dysfunktion im Rahmen vieler pathophysiologischer Situationen von Zellen und im Rahmen der Zellalterung gesehen [44].

Zu den Phospholipiden zählt auch das Cardiolipin, welches auf Grund seiner chemischen und strukturellen Charakteristika sowie auf Grund seiner Lokalisation in der inneren Mitochondrienmembran, wo es auch synthetisiert wird, eine interessante Stellung einnimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Cardiolipin an der Regulation einiger mitochondrialer bioenergetischer Prozesse beteiligt ist und dabei die Aktivität einiger Schlüsselproteine der oxidativen Phosphorylierung von ADP reguliert (siehe Tabelle 1) [50].

Mitochondriales Kompartiment	durch Cardiolipin regulierte Proteine
Innere Membran	ADP-ATP Transporter Phosphat Transporter Pyruvat Transporter Carnitin Transporter Komplex I Komplex II Cytochrom – Oxidase (Komplex IV) ATP-Synthase (Komplex V) Cytochrom P450SCC Cardiolipinsynthase
Intermembranöser Raum	Cytochrom C Kreatinkinase

Tabelle 1: Cardiolipin abhängige Proteine in Mitochondrien. Abkürzungen: ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat.

Die Idee für die Tabelle stammt aus: [50]

Veränderungen in der Struktur dieses Phospholipides sind für Dysfunktionen der mitochondrialen Atmungskette verantwortlich. Auf Grund des hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren und seiner Lokalisation in unmittelbarer Nähe der Radikalbildungsorte stellt das Cardiolipin ein geradezu prädiktives Ziel für oxidative Angriffe durch ROS dar. Der Verlust von Cardiolipin auf Grund ROS induzierter Peroxidation in Herzzellen nach Ischämie/Reperfusion und der damit einhergehende mitochondrialen Dysfunktion wurde in Studien gut dokumentiert und belegt [45]. In neuesten kristallographischen Strukturanalysen wurden gebundene Cardiolipinmoleküle im Komplex III, im Komplex IV sowie im ADP/ATP Transporter nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Cardiolipin ein integraler Bestandteil der Komplexe der Atmungskette ist und bei deren Faltung, oligometrischen Strukturordnung und -stabilisierung sowie deren Funktion eine wichtige regulierende Rolle spielt [49].

Zusammenfassend kann also die Aussage aufgestellt werden, dass Veränderungen im Cardiolipin durch ROS vermittelte oxidative Prozesse zur Dysfunktion der mitochondrialen re-

spiratorischen Aktivität führt. Paradies et al formulierten diesen Zusammenhang folgendermaßen: „die Oxidation von mitochondrialen Cardiolipin scheint für die ROS induzierten Veränderungen in den Komplexen I, III und IV der Atmungskette verantwortlich zu sein“ [44].

1.5. Abwehrmechanismen der Zelle gegen ROS

Mitochondrien verbrauchen 80-90% des in der Zelle enthaltenen Sauerstoffes für die ATP-Produktion. Es wird angenommen, dass etwa 0,2 – 2% des von der Zelle aufgenommenen Sauerstoffes durch die Mitochondrien in ROS umgewandelt wird [44]. Zu beachten ist, dass diese ROS oftmals mit dem in den Zellen enthaltenen Stickstoffmonoxid (NO) weiterreagieren. Dabei entsteht das hoch reaktive und zytotoxische Peroxynitrit (ONOO^-). Dieses zählt zu den sogenannten RNOS („reactive nitrogen oxide species“) [56].

Um ROS und RNOS induzierte zelluläre Schäden zu vermindern bzw. abzuwehren, sind aerob arbeitende Zellen mit sogenannten Peroxidase Enzymen ausgestattet. Zu diesen Peroxidase Enzymen zählen, Peroxiredoxin, Glutathionperoxidase und die Katalase. Sie können Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O) reduzieren. [25, 31]. Die bereits erwähnte mitochondriale Mangan – Superoxiddismutase (MnSOD) wandelt das in den Mitochondrien anfallende Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um und zählt daher auch zu den antioxidativ arbeitenden Enzymen [53]. Neben der mitochondrialen gibt es eine weitere wichtige Superoxiddismutase: die Kupfer/Zink abhängige Superoxiddismutase 1 (SOD1). Sie kommt im Zytoplasma, im Zellkern und in den Mikrosomen der Zellen vor und spielt eine wichtige Rolle beim Abfangen von Superoxidanionen außerhalb der Mitochondrien. Bei einem Funktionsverlust der SOD1 in Mäusen konnte ein Zusammenhang zur Entstehung der Amytrophischen Lateralsklerose festgestellt werden [25].

In Nervenzellen konnte gezeigt werden, dass die Katalaseaktivität und die Glutathionkonzentration in den Zellen bei oxidativen Stress ansteigt. Jedoch muss sich das ROS Level um das Dreifache erhöhen um überhaupt einen Anstieg der antioxidativen Abwehr in den Nervenzellen zu bewirken [3]. Clerch und Massao konnten zeigen, dass in Zellen aus Lungengewebe adulter Ratte eine steigende MnSOD- Aktivität und –Stabilität eine wichtige Rolle bei der Toleranz hyperoxygener Bedingungen spielt [10, 58].

Neben der Anpassung der Aktivität und Synthese antioxidativer Enzyme wurde auch eine Anpassung isolierter Mitochondrien an hyperoxygene Bedingung nachgewiesen. Zhao et al

untersuchten hierfür Mitochondrien, die aus Fliegen stammen, welche unter 95%iger Sauerstoffexposition aufwuchsen, die sogenannten $S_{O_2}A$ Fliegen [58]. Sie verglichen deren Aktivität unter Paraquat induzierten oxidativen Stress mit Mitochondrien aus Kontrollfliegen, die unter normobaren Bedingungen aufwuchsen. Dabei stellte sich heraus, dass $S_{O_2}A$ Fliegen unter oxidativen Stress länger überleben. Sie zeigten dabei eine abnehmende ROS Produktion und Sauerstoffverbrauch. Zudem nahm die Aktivität des Komplexes I und des Komplexes III ab. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese aufstellen, dass eine anhaltende Hyperoxie adaptive Veränderungen in diesen beiden Komplexen hervorruft, um eine Reduktion der Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$)-produktion zu erreichen [7, 58]. Es konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale SIRT3 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-3), ein NAD^+ enthaltendes mitochondriales Enzym, die respiratorische Aktivität des Komplexes I mittels Deacetylierung modulieren kann. Man kann also davon ausgehen, dass eine Hochregulierung von SIRT3 den oxidativen Schaden in den Mitochondrien reduzieren kann [25].

1.6. Hyperoxie – Definition

Im Kontext dieser Versuchsreihe stellt sich die Frage, ab welchem Sauerstoffpartialdruck man von einer „Hyperoxie“ sprechen kann. Der Begriff hyperoxygene Umgebung impliziert einen höheren Sauerstoffpartialdruck als der im menschlichen Körper üblich vorherrschende. Dies bedeutet konkret, dass in vitro bei einem Sauerstoffumgebungsdruck von über 20,9 Prozent (Atmosphärendruck auf Meereshöhe = 760mmHg \rightarrow 20,9 % entsprechen ca. 159mmHg) für Körperzellen, die aus Säugetieren stammen bereits eine Hyperoxie besteht, da dieser über dem im Gewebe üblichen und von den Zellen gewohnten Partialdruck liegt. Eine Ausnahme stellen die Zellen der Lunge dar. Zellen des Lungengewebes sind normalerweise Sauerstoffpartialdrücken von etwa 100mmHg ausgesetzt [29]. In anderen Organen und Körperabschnitten ist der Sauerstoffpartialdruck um einiges geringer. Er beträgt beispielsweise im Nervengewebe von Ratengehirnen bei Ventilation von Raumluft zwischen 30 und 40mmHg [30]. Hierbei sollte jedoch angemerkt werden, dass die Messung des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe durchaus schwierig ist, da dieser breiten Schwankungen unterliegt, welche unter anderem vom Aktivitätsniveau des zu messenden Gewebes abhängig ist. Reflektiert man diese Begebenheiten stellt sich nun die Frage, ob Zellen, die aus dem Lungengewebe stammen und höhere Sauerstoffpartialdrücke von etwa

100mmHg gewöhnt sind, auch bessere Adaptationsmöglichkeiten gegenüber Sauerstoff bzw. den schädigenden Sauerstoffradikalen besitzen, als Zellen, die ubiquitär im Körper vorkommen.

Auf zellulärer Ebene muss der Begriff „Hyperoxie“ anders beleuchtet und definiert werden. Im zellulären Kontext bedeutet der Begriff „Hyperoxie“ einen Überschuss an molekularem Sauerstoff, der für die Atmungskette zur Verfügung steht. Vorangehende Versuchsreihen mit Alveolarmakrophagen haben gezeigt, dass bereits bei einem Sauerstoffumgebungsdruck von etwa 6,2mmHg in vitro, die mitochondriale Atmung 95 Prozent ihrer maximalen Aktivität erreicht. Liegt der Sauerstoffpartialdruck also oberhalb dieser 6,2mmHg liegt für die Zelle in vitro bereits eine hyperoxygene Umgebung vor [38]

1.7. Hypothese und Fragestellung der Studie

Wie bereits beschrieben sind Zellen aus der Lunge höheren Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt, als Zellen die ubiquitär im Körper vorkommen. In dieser Versuchsreihe sollen daher Zellen die höhere Sauerstoffpartialdrücke gewöhnt sind, mit Zellen aus niederen Sauerstoffpartialdruckregionen, bezüglich ihrer Anfälligkeit gegenüber hyperoxygenen Bedingungen verglichen werden. Als Maß dieser Anfälligkeit wird die respiratorische Kapazität der Zellen herangezogen. Zellen der Lunge repräsentieren die Alveolarmakrophagen (LAM). In vorangegangenen Studien konnte bei Ihnen bereits eine Minderung der respiratorischen Kapazität bei 24 stündiger Exposition gegenüber hyperoxygenen Bedingungen festgestellt werden [6]. Die ubiquitär im Körper vorkommenden Zellen werden durch die RAW 264.7 Makrophagen vertreten, bei denen wir unter Hyperoxiebedingungen eine noch stärkere Verminderung der mitochondrialen Atmungskapazität erwarteten.

Die erste Hypothese, die sich auf Grundlage der vorangehenden Überlegungen aufstellen lässt, lautet daher: Eine 24 - stündige Exposition in einer hyperoxygenen Umgebung führt zu einer Schädigung beider Zellreihen. Diese 24 Stunden-Hyperoxie schädigt die Alveolarmakrophagen jedoch, auf Grund ihrer Herkunft aus der Lunge, in einem geringeren Ausmaß als die Zellreihe der RAW-Makrophagen. Die respiratorische Kapazität der Alveolarmakrophagen ist nach einer 24 Stunden Hyperoxie also weniger eingeschränkt als bei den RAW Makrophagen.

Somit sollte die folgende erste Fragestellung untersucht werden: Gibt es Unterschiede in den beiden Zellreihen gegenüber einer 24 Stunden andauernden Hyperoxie? Das heißt, können sich die Alveolarmakrophagen einer hyperoxygenen Umgebung besser anpassen, als die RAW-Makrophagen?

Wie die bereits in der Einleitung aufgeführten Studien gezeigt haben, bewirkt Hyperoxie einen Schaden in den Mitochondrien mit Auswirkung auf die Leistungsfähigkeit der Atmungskette. [14, 40]. Auf diese schädigende Wirkung konnten Abwehrmechanismen in den Zellen und Mitochondrien identifiziert werden, welche unter hyperoxygenen Bedingungen hochreguliert werden.

Unsere vorangehenden Untersuchungen ließen ein grundlegendes Modell aufstellen: bei einer 24 Stunden andauernden Hyperoxie konnte eine Schädigung der Mitochondrien in Alveolarmakrophagen gefunden werden [6]. Auf dieser Grundlage lässt sich nun die Über-

legung aufbauen, dass sich dieser hyperoxygene Schaden durch eine vorangehende Sauerstoffexposition beeinflussen lässt. In der vorliegenden Versuchsreihe wurden deshalb eine hyperbare Sauerstofftherapie von zwei Stunden und eine darauffolgende Luftpause von acht Stunden unternommen, die der 24 stündigen Hyperoxie vorausgingen. Die Intention dieser vorangeschalteten hyperbaren Sauerstofftherapie, war, die Nebenwirkungen der Hyperoxie zu vermindern durch eine Adaptation der Zellen an hohe Sauerstoffpartialdrücke.

Es lässt sich nun eine zweite Hypothese aufstellen. Diese lautet: Eine kurze Sequenz von zwei Stunden Hyperoxie bewirkt eine Reaktion in den Zellen, die den Schaden in den Mitochondrien auf die nachfolgende 24 Stunden Hyperoxie gegenüber den zuvor nicht exponierten Zellen verringert. Somit sollte im Rahmen der Versuchsreihe die folgende zweite Fragestellung untersucht werden:

Kann eine kurze Exposition von zwei Stunden gegenüber der hyperoxygenen Umgebung den Schaden während der 24 Stunden Hyperoxie in den Mitochondrien reduzieren? Findet also eine Prekonditionierung der Zellen gegenüber Sauerstoff statt?

Zur Konkretisierung dieser beiden Fragestellungen wurden die folgenden weiterführenden, spezifischen Fragen aufgestellt:

- Welche Effekte der Hyperoxie lassen sich auf die globale Funktion der Atmungskette beobachten?
- Welchen Effekt hat die Hyperoxie auf bestimmte Bereiche der Atmungskette?
- Welcher Komplex ist von den Effekten der Hyperoxie am stärksten betroffen?
- Gibt es Hinweise auf Kompensation? Kann ein Komplex die verminderte Aktivität eines anderen Komplexes kompensieren?
- Gibt es konkrete Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff bei den beiden verschiedenen Zelltypen?

2. Material und Methoden

2.1. Studienaufbau

Insgesamt gliedert sich die experimentelle Arbeit in drei Versuchsarme: die Kontrollgruppe, die 24-Stunden-Hyperoxiegruppe und die Gruppe der sequentiellen Exposition.

- Die Zellkulturen der Kontrollgruppe wurden für ca. 48 Stunden bei Raumluft (95%Luft 5%CO₂) kultiviert.
- Bei der 24 Stunden-Hyperoxiegruppe wurden die Zellkulturen für ca. 24 Stunden bei Raumluft und danach für 24 Stunden in einer hyperoxygenen (95% O₂, 5%CO₂) Umgebung kultiviert.
- Die Zellkulturen der Gruppe der sequentiellen Exposition wurden für 24 Stunden gegenüber Raumluft, für 2h der hyperoxygenen (95%O₂, 5%CO₂) Umgebung zur Adaptation an eine hohe Sauerstoffkonzentration, dann für 8 Stunden gegenüber Raumluft und für 24 Stunden der hyperoxygenen Umgebung ausgesetzt. Diese Gruppe wird in dieser Arbeit als die „Interventionsgruppe“ bezeichnet.

In jedem der drei Versuchsarme wurden jeweils mindestens acht RAW 264.7 Makrophagenkulturen und mindestens acht Alveolarmakrophagenkulturen (LAM) untersucht, sodass eine Gesamtanzahl von 62 Versuchen erreicht wurde. Die Versuche der Kontrollgruppe wurden als erstes durchgeführt. Aus Übungsgründen an die Methode wurden hierbei zunächst weitaus mehr als acht Versuche durchgeführt. Daraus ergibt sich die Anzahl an elf Versuchen in der Kontrollgruppe der Alveolarmakrophagen.

2.2. Verwendete Geräte und Materialien

2.2.1. Laborgeräte

BD Conical Centrifuge Tubes 50ml	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Bechergläser	Schott, Glas Mainz
BGA- Gerät ABL 700 Series	Radiometer GmbH, Copenhagen
Brand® counting chamber, Zellzählkammer	Blaubrand, Wertheim
Cell Star® Serological Pipette 10ml	Greiner bio one, Frickenhausen
Eppendorf Reference® Pipette	Eppendorf, Hamburg
Expositionskammer, Eigenbau	Werkstatt der Universität Ulm, Ulm
Falcons Cellstar Tubes 50ml	Greiner bio one, Frickenhausen
Gastight #1701 10µl Applikationsspritze	Hamilton-Bonaduz, Schweiz
Gastight #1702 25µl Applikationsspritze	Hamilton-Bonaduz, Schweiz
Gastight #1705 50µl Applikationsspritze	Hamilton-Bonaduz, Schweiz
Glass Line Kühlschranks	Liebherr, Bulle, Schweiz
Heracell 150i CO ₂ Incubator	Heraeus, GB
Heraeus instrument vacuotherm Inkubations- schrank	Heraeus, GB
Injekt® Spritze 10ml	B.Braun, Melsungen
Injekt® Spritze 25ml	B.Braun, Melsungen
Micro Test Tubes 1,5ml (Eppis)	Eppendorf, Hamburg
Micro Test Tubes 2ml (Eppis)	Eppendorf, Hamburg
Omnix® Spritze	B.Braun, Melsungen
Oroboros Oxygraph-2K	Oroboros Instruments, Innsbruck, Aus- tria
Perfusor Spritze	B.Braun, Melsungen

Shaker S4, Schüttelgerät	Elmi, Riga Lettland
Zeiss-Axio Imager A1 Lichtmikroskop	Carl Zeiss Jena
Zellkulturflaschen	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Zellschaber	Greiner bio one, Frickenhausen
Zentrifuge: Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

2.2.2. Chemikalien, Reagenzien

ADP	Sigma Aldrich, Hamburg
Antimycin A	Sigma Aldrich, Hamburg
Ascorbat	Sigma Aldrich, Hamburg
Bromphenolblau	Sigma, Aldrich Steinheim
Cytochrom C	Sigma Aldrich, Hamburg
Digitonin	Sigma Aldrich, Hamburg
Ethanol 70%	Merck, Eurolabs Ulm
Ethanol 90%	Merck, Eurolabs Ulm
Glutamat	Sigma Aldrich, Hamburg
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	MTI, Industriegase Ulm
Malat	Sigma Aldrich, Hamburg
Natriumsulfid (Na ₂ S)	Sigma Aldrich, Hamburg
Pyruvat	Sigma Aldrich, Hamburg
Reinigungslösung für die Zellen: PBS - Lösung (phosphate bufferd saline)	Biochrom, Berlin
Respirationsmedium MIR 06	Fresenius, Bad Homburg
Rotenon	Sigma Aldrich, Hamburg
Sauerstoff (O ₂)	MTI, Industriegase Ulm

Succinat	Sigma Aldrich, Hamburg
TMPD	Sigma Aldrich, Hamburg

2.2.3. Zellkulturen, Zellmedium

Lung Alveolarmacrophages (LAM) /AMJ2-C11 macrophages cell lines	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
RAW 264.7 -Makrophagen	European Type Culture Collection, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany

2.2.4. Software

DatLab Software, Version 4.3	Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria
Excel 2007, 2013	Microsoft, Redmond, WA, USA
Graph Pad Prism 06	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Mendeley Desktop 1.8	Mendeley, London, UK
Word 2013	Microsoft, Redmond, WA, USA

2.3. Methoden

2.3.1. Zellkulturen – Anlage und Aufbereitung

Bei den RAW 264.7-Makrophagen (im folgenden Text als RAW-Makrophagen bezeichnet) handelt es sich um Maus-Makrophagen. Ursprünglich stammen sie aus dem Aszites eines Tumors, der in männlichen BAB/14 Mäusen durch intraperitoneale Injektion von Abelson Leukämie Virus (A-MuLv) induziert wurde [48]. Es handelt sich also um Zellen, die ubiquitär im Körper vorkommen.

Bei den AMJ2-C11 Makrophagen hingegen (im folgenden Text als LAM (Lung Alveolar Macrophages) bezeichnet), handelt es sich um Makrophagen aus der Mauslunge, die mit dem onkogenen (v-raf und v-myc) Retrovirus J2 immortalisiert wurden [43]. Diese Onkogene können natürlich in den Zellmetabolismus eingreifen.

Die beiden Zelllinien wurden in vielen Studien untersucht, dabei konnte kein wesentlicher Unterschied zu anderen Zellen festgestellt werden [23].

Sowohl die RAW Makrophagen als auch die LAM-Zellen wurden für 48 Stunden bei 37 Grad Celsius in Standardmedium (DMEM, Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) kultiviert. Dieses Standardmedium wurde mit 10% Fötalem Kälberserum, 1% nicht essentiellen Aminosäuren, 1% Glutamat und 0,5% Gentamicin angereichert.

2.3.2. Hyperoxygenierung der Zellkultur

Die 24 Stunden Hyperoxiegruppe und die sequentiell exponierten Zellen wurden mit dem hier beschriebenen Verfahren vor der eigentlichen respirometrischen Messung einer hyperoxygenen (95% O₂, 5% CO₂) Umgebung ausgesetzt. Dazu wurde die Zellkulturflasche in eine 7,2 Liter fassende luftdichte Kammer (siehe Abbildung 2) gelegt. In diese Expositions-kammer wurde für ca. fünf Minuten reiner Sauerstoff über zwei Applikationschläuche (siehe Abbildung 2) gefüllt. Beim Fluten der Kammer mit Sauerstoff wurde gleichzeitig die Raumluft über ein Ausgangsventil (siehe Abbildung 2) abgelassen. Zum reinen Sauerstoff in der Kammer konnte nun 400ml reines Kohlenstoffdioxid appliziert werden. Mit Hilfe einer 100ml Omnix-Spritze wurde der Sauerstoff und das Kohlenstoffdioxid durch Ab – und Zu-pumpen des Gasgemisches über einen der Applikationsschläuche in der Kammer ver-

mischt. Danach konnte eine repräsentative Gasprobe von 10ml aus der Kammer entnommen werden. Mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes wurde überprüft, ob das Gasgemisch dem gewünschten Verhältnis von 95% O₂ und 5% CO₂ entspricht. Konnten die gewünschten Werte erreicht werden, so wurden die Zellkulturen für das vorgesehene Zeitintervall von zwei oder 24 Stunden in der Kammer belassen. Die Kammer wurde dazu in einen Wärmeschrank mit 37 Grad Celsius Innentemperatur gestellt.

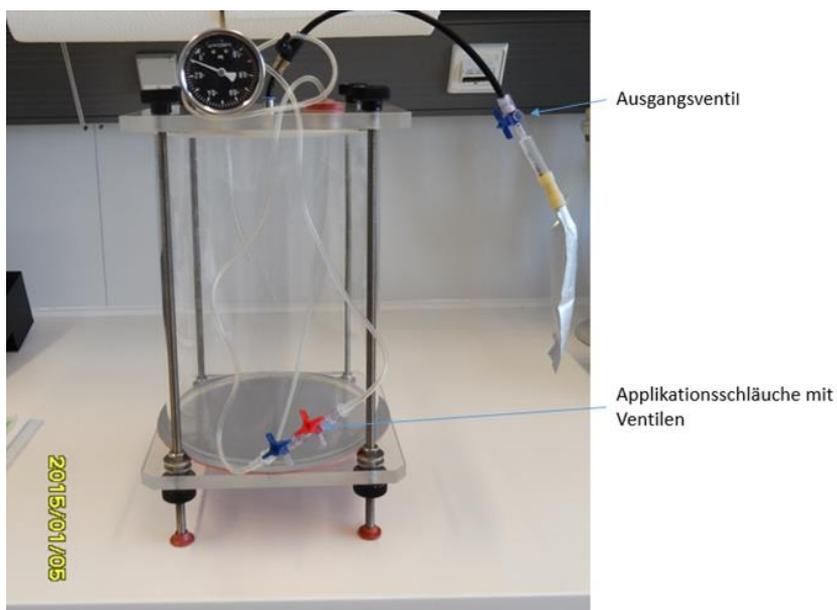


Abbildung 2: Expositions-kammer mit Applikationsschläuchen und Ausgangsventil zum Fluten der Kammer mit Sauerstoff. Eigene Fotografie der in der Werkstatt der Universität Ulm gebauten Expositions-kammer.

2.3.3. Vorbereitung der Zellkulturen

Nachdem die Zellen wie oben bereits beschrieben mindestens 48 Stunden kultiviert wurden, konnten sie mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig in der Kulturflasche in ihr Medium abgekratzt und geerntet werden. Mit Hilfe einer Cell Star® Serological Pipette wurden die Zellen im Medium aus der Kulturflasche in ein Zentrifugentube gefüllt. In diesem wurden sie für 3 Minuten, bei 37 Grad Celsius, bei einer Geschwindigkeit von 3000 rpm/rcf zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnte das Medium abpipettiert und die Zellen mit 10ml PBS-Lösung gewaschen werden. Um die Zellen wieder von der PBS- Lösung zu trennen, wurden sie erneut für 3 min, bei 37 Grad Celsius, bei 3000 rpm/rcf zentrifugiert und die

PBS- Lösung danach abgeschüttet. Die Zellen konnten nun in 10ml des Messmediums MIR 06 gegeben und mit diesem gut durchmischt werden.

Der Oxygenator besitzt zwei Messkammern, die Kammer A und die Kammer B. In jeweils eine Kammer wurden nun 3200µl reines Respirationsmedium und 1600µl des Zell-Respirationsmedium-Gemisches mit Hilfe der Eppendorf Pipette abgefüllt. Aus den beiden Kammern wurde im nächsten Schritt jedoch nochmals Proben der Zelllösung zur Bestimmung der Citratsynthase, der LDH- und der Proteinkonzentration entnommen. Für die Proteinkonzentration wurden 1000µl, für die die Citratsynthase- und LDH-Konzentration wurden jeweils 500µl abpipettiert und in einem Micro Test Tube in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zusätzlich wurden aus jeder Kammer für die Zellzählung (siehe unten) 2 Proben von je zehn µl entnommen. Somit war für die Messung in jeder Kammer noch 2780µl Zelllösung enthalten.

2.3.4. High Resolution Respirometrie – das Messprinzip

Die zelluläre Sauerstoffaufnahme wurde durch die hochauflösende Respirometrie mit Hilfe des Oroboros Oxygraph -2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) gemessen. Dieses Gerät erlaubt die simultane Aufzeichnung der Sauerstoffkonzentration in zwei Kammern, Kammer A und B.

Die Kalibrierung der Kammern fand mit 2ml Respirationsmedium MIR 06 statt. Das Respirationsmedium MiR06 enthält 10mM anorganischen Phosphat und 3mM Magnesium. Phosphatkonzentrationen, die unter 10mM liegen limitieren die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP [20]. Das Medium wurde für 30 bis 60 Minuten mit Luft in den Kammern kalibriert, bis sich ein stabiles Signal unter Luftsättigung aufzeichnen ließ. Die Kalibrierung fand im Modus „Instrumental background flux“ statt.

Die vorbereiteten Zellen wurden mit dem Respirationsmedium in einer Konzentration von 0,5 zu $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml angesetzt und in die Kammer A und B gegeben. Die entstandene Zellsuspension wurde kontinuierlich in den Kammern bei 750 rpm gerührt. Die Zellatmung konnte nun anhand der Sauerstoffdurchflussrate (JO_2) quantifiziert werden. Der Oxygraph kann die Sauerstoffdurchflussrate mit Hilfe der Änderungsrate der Sauerstoffkonzentration in den Kammern ermitteln [38].

2.3.4.1. *Aufbau des Oxygraphen – Prinzip der Sauerstoffmessung*

Der hier verwendete Oxygraph ist ein Zwei- Kammer-Titrations-Injektionsrespirometer für die hochauflösende Atmungskettenmessung. Die beiden Kammern können mit Hilfe eines Stopfens jeweils luftdicht verschlossen werden. Im Innern jedes Stopfens befindet sich jeweils eine dünne Kapillare, durch die mittels einer Injektionskanüle verschieden Substanzen in die Kammern appliziert werden können. Die Temperatur wurde mithilfe eines, im Oxygraphen integrierten, Peltierelementes während der Messung konstant auf 37 Grad Celsius gehalten [16].

In den beiden Kammern befinden sich zwei polarographische Sauerstoffsensoren (POS Elektroden), die den elektrischen Fluss I [A] messen. Sie bestehen aus einer Platinkathode und einer Silberanode und werden von einer gesättigten Kaliumchloridlösung umgeben. Die Sensoren sind mit einer sauerstoffdurchlässigen Teflonmembran umhüllt. Der in der Probe enthaltene Sauerstoff kann also die Teflonmembran passieren und wird an der Katode zu Wasser reduziert. Es entsteht ein elektrischer Fluss. Dieser gemessene Stromfluss ist direkt proportional zum vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck der Versuchslösung in der Kammer [18, 46].

Durch kontinuierliches Rühren während der Messung mit Hilfe eines elektromagnetischen Rührers wurde eine optimale Durchmischung des Mediums und der Zellen gewährleistet und eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Nähe der Kathode vermieden.

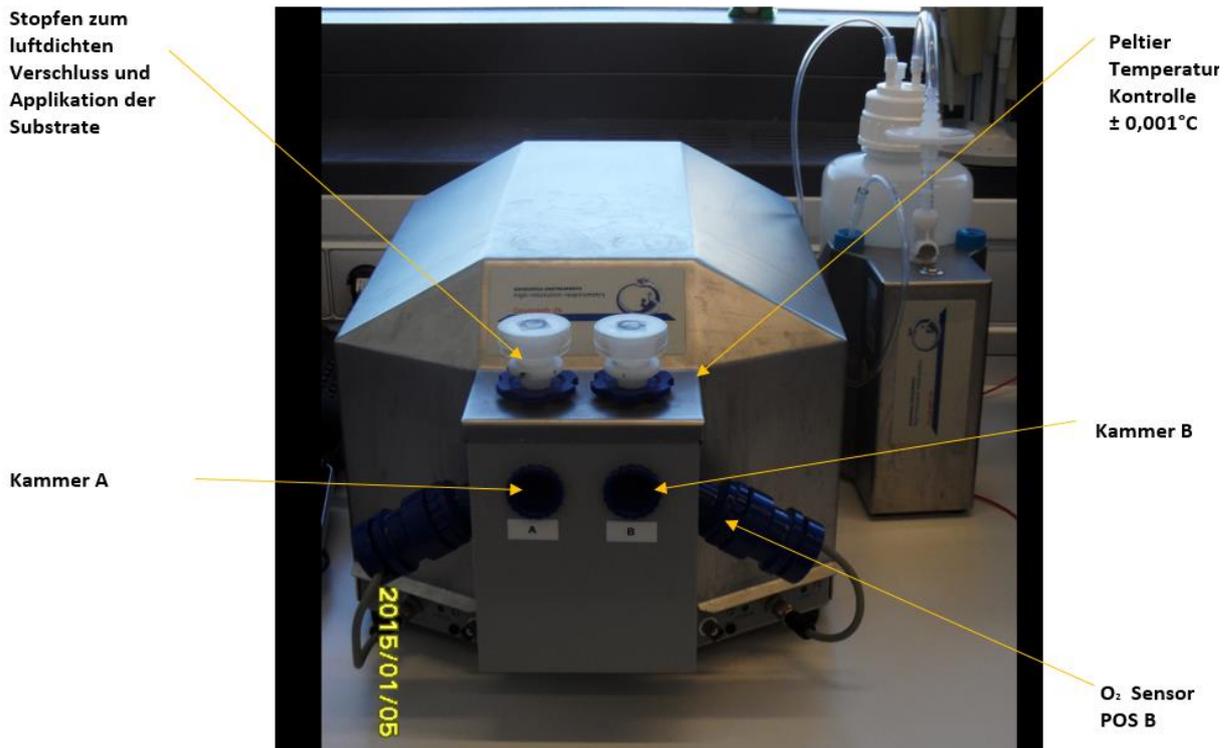


Abbildung 3: Darstellung und Aufbau eines Oroboros Oxygraph-2K; Eigene Fotografie. (Schriftliches Einverständnis der Firma Oroboros für das Benutzen des Fotos ist vorliegend)

POS: polarographischer Sauerstoffsensoren, O₂: molekularer Sauerstoff, °C: Grad Celcius

Die mit den POS Elektroden kontinuierlich gemessene Sauerstoffkonzentration wurde mit Hilfe des Programmes DatLab Software, Version 4.3, Innsbruck, Österreich, ausgewertet. Dabei ergaben sich zwei Kurven (vergleiche Abbildung 4): die, an den POS-Elektroden gemessene Sauerstoffkonzentration (blaue Linie) und die Kurve der Sauerstoffdurchflussrate JO₂ pro Zelle (rote Linie). Diese errechnet sich aus der Änderung der gemessenen Sauerstoffkonzentration über die Zeit in Abhängigkeit von der in der Kammer vorhandenen Zellzahl. Diese wurde durch Zellzählung bestimmt.

2.3.5. Zellzählung

Mithilfe der Zell-Zählkammer (Brand® counting chamber) wurden unter dem Lichtmikroskop die Zellen gezählt, die in zehn µl Zelllösung enthalten waren. Dazu wurden zehn µl Zelllösung mit 20µl Bromphenolblau angefärbt und unter dem Lichtmikroskop händisch ausgezählt. Es konnte dabei zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Diese Auszählergebnisse wurden in die DatLab software, Version 4.3, Innsbruck, Österreich,

eingetragen und somit konnte nun die Sauerstoffdurchflussrate JO_2 pro Zelle, (rote Linie, siehe Abbildung 4) nachvollzogen werden.

2.3.6. *Respirometrische Messung - ein Überblick über den gesamten Versuchslauf*

Die Messkammern wurden mit je 2780 μ l Zelllösung befüllt und luftdicht verschlossen. Nachdem beide Kurven ein Plateau erreichten, wurden die weiter unten ausführlicher beschriebenen Substanzen nacheinander mithilfe von Injektor Spritzen in die Kammern A und B appliziert. Zwischen den einzelnen Gaben der Substanzen wurde jeweils für fünf bis zehn Minuten abgewartet, bis die Sauerstoffdurchflusskurve (JO_2) wieder ein Plateau erreicht hatte. Zur Übersicht des Ablaufes des gesamten Versuches mit allen applizierten Substraten und Inhibitoren dient die nachfolgende Abbildung.

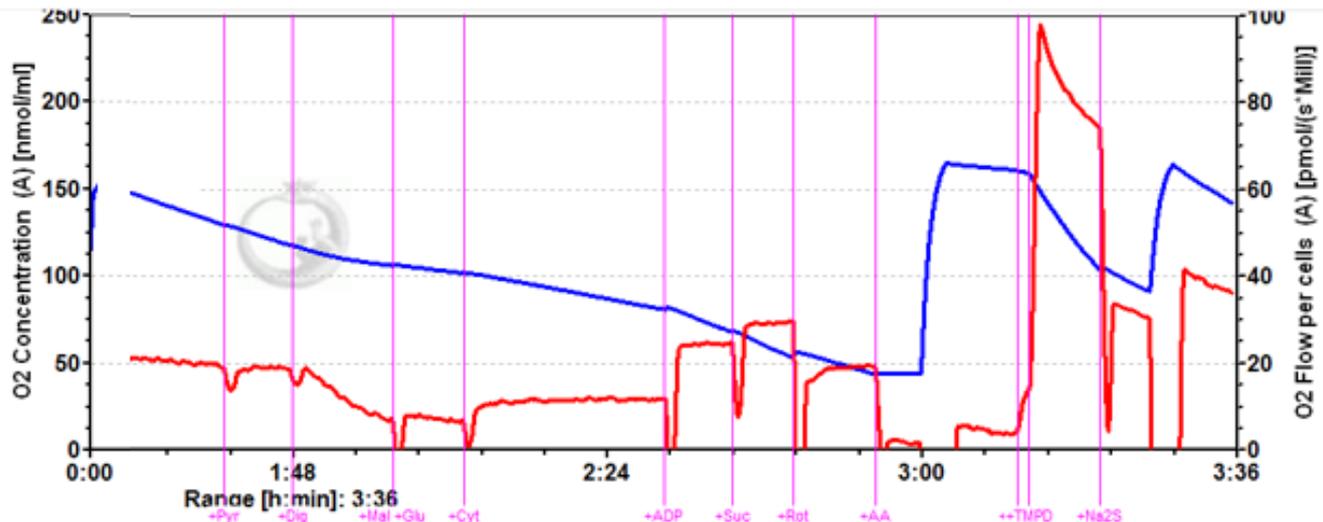


Abbildung 4: Aufzeichnung der respirometrischen Messung mit Hilfe des DatLab Software 4.3 Programmes. Die blaue Kurve stellt die in der Kammer, mit Hilfe der polarographischen Sauerstoffsensoren, gemessene Sauerstoffkonzentration dar. Die rote Kurve zeigt die Sauerstoffdurchflussrate (JO_2), pro Zelle die das Programm anhand der Änderungsrate der Sauerstoffkonzentration und der ausgezählten Zellzahl errechnet. Pyr: Pyruvat, Dig: Digitonin, Mal: Malat, Glu: Glutamat, Cyt: Cytochrom C, ADP: Adenosindiphosphat, Suc: Succinat, Rot: Rotenon, AA: Antimycin A, TMPD: Tetramethylphenylendiamin, Na₂S: Natriumsulfid

2.3.7. Mitochondriale Respirationsstadien nach Nicholls und Ferguson

Die respiratorischen Stadien der Mitochondrien wurden 1956 erstmals von Chance und Williams beschrieben. Diese Stadien geben eine typische Reihenfolge der zu applizierenden Substrate während eines Versuches vor [8]. 1992 wurde diese Reihenfolge von Nicholls und Ferguson noch einmal abgeändert und es ergaben sich die folgenden mitochondrialen Respirationsstadien [19]:

- Stadium 1:** Das ADP- und das Substratlevel sind niedrig. Nur die Mitochondrien mit dem Phosphat des Respirationsmediums sind vorhanden. Die mitochondriale Atmung ist folglich gering
- Stadium 2:** Das ist Substratlevel hoch. Die mitochondriale Atmung ist jedoch gering auf Grund des Mangels von ADP
- Stadium 3:** Beschränkte Zugabe von ADP. Das Substrat und das ADP-Level sind hoch. Die mitochondriale Atmungskapazität ist hoch.

Stadium 4: Das vorhandene ADP wird durch die Phosphorylierung in ATP umgewandelt, das ADP-Level ist niedrig, das Substratlevel hoch. Die mitochondriale Atmung nimmt wieder ab.

Stadium 5: Anoxisches Stadium, es herrscht ein Sauerstoffmangel vor. Die mitochondriale Atmung wird durch den Mangel an Sauerstoff limitiert.

Auch in dieser Versuchsreihe geben die hier beschriebenen respiratorischen Stadien eine Orientierung für die Reihenfolge der zu applizierenden Substanzen vor. Hierbei entspricht das Stadium 3 am ehesten der Zielsetzung der Arbeit, da in diesem Stadium die maximale mitochondriale Atmungskapazität erreicht wird. Die mitochondriale Atmungskapazität wird auch als sogenannte OXPHOS-Kapazität, Stadium P, bezeichnet. Dies entspricht der respiratorischen Aktivität, die nach ADP Zugabe, in sättigender Konzentration, erreicht wird [17, 19]. Die OXPHOS-Kapazität stellt daher das quantitative Maß dieser Versuchsreihe dar. Sie zeigt wie gut die mitochondriale Atmung in ihrer Gesamtheit arbeitet. Zudem kann durch die Zugabe inhibitorischer Substanzen die OXPHOS - Kapazität der einzelnen Komplexe I, II und IV isoliert betrachtet werden.

2.3.8. *Respirometrische Messung – Erreichen der OXPHOS Kapazität*

Die quantitative Messung der maximalen OXPHOS-Kapazität stellt, wie bereits beschrieben, das primäre Ziel unserer Versuchsreihe dar. Dabei sollten nicht nur die Komplexe der Atmungskette in ihrer Gesamtaktivität untersucht werden, sondern auch die respiratorische Kapazität der einzelnen Komplexe I, II und IV. Um die maximalen OXPHOS Kapazität der gesamten Atmungskette und der einzelnen Komplexe zu erreichen, wurden die nachfolgend aufgelisteten Substrate in dieser Reihenfolge nacheinander in die Kammern appliziert. Zwischen der Applikation der einzelnen Substanzen wurde jeweils für fünf bis zehn Minuten abgewartet, bis die Sauerstoffdurchflusskurve pro Zelle (rote Kurve, siehe Abbildung 5) wieder ein Plateau erreichte.

1. 10 µl Pyruvat

Pyruvat fördert als Substrat des Citratzyklus die mitochondriale Atmungskette [22]. Es hat eine antioxidative Funktion. In Bezug auf Erfahrungswerten aus vorausgegangen Versuchen

wird durch Pyruvat ein längeres Überleben der Zellen während eines Versuches gewährleistet. Aus diesem Grund wurde es gleich zu Beginn des Versuches appliziert.

Pyruvat wird durch die Pyruvatdehydrogenase zu Acetyl CoA decarboxyliert und kann mit Oxalacetat in den Citratzyklus eingehen. (vgl. Punkt 3, vgl. Abbildung 6)

2. 3,0µl Digitonin (4,05µM)

Digitonin zählt zu den Steroidglykosiden und kann Plasmamembranen permeabilisieren. Es zählt zu den sogenannten nichtionischen Detergensen und wird häufig zum Herauslösen von Membran-gebundenen Proteinen verwendet. Digitonin permeabilisiert bei Konzentrationen von 10-10000µg/ml nur die Cholesterin-reiche Plasmamembran, nicht aber die Organellen. Somit wurde im Versuch mit der Gabe von Digitonin die Plasmamembran der Zellwand für die nachfolgend verabreichten Substanzen durchlässig gemacht, die Mitochondrien, auf Grund ihres geringen Cholesteringehaltes damit jedoch nicht angegriffen [21, 42, 46].

3. 12,5µl Malat (5mM) und 10µl Glutamat (10mM)

Malat und Glutamat sind anionische Aminosäuren, die nicht frei über Zellmembranen permeieren können, sondern aktive Transporter dafür brauchen, dies gilt auch für Pyruvat. Verschiedene Anionentransporter in der inneren Mitochondrienmembran stehen für den Transport mitochondrialer Metaboliten zur Verfügung. Ihr Vertreib über die mitochondriale Membran ist vor allem pH abhängig. Da die meisten Transporter anionisch arbeiten, gelingt der Transport durch Anionenaustausch oder durch Cotransport von Protonen.

Malat und Glutamat zählen zu den nicht essentiellen Aminosäuren. Die Zugabe dieser beiden Substanzen stellt die Verfügbarkeit des Reduktionsäquivalentes NADH in der Matrix der Mitochondrien sicher.

Die Substratkombination von Pyruvat und Malat sowie Glutamat und Malat aktiviert mitochondriale Dehydrogenasen. Es kommt zur Reduktion von Nikotinamid Adenin Dinukleotid ($\text{NADH}^+ \rightarrow \text{NADH}$). Das reduzierte NADH kann nun als Substrat des Komplexes I die Atmungskette in Gang setzen.

Glutamat und Malat

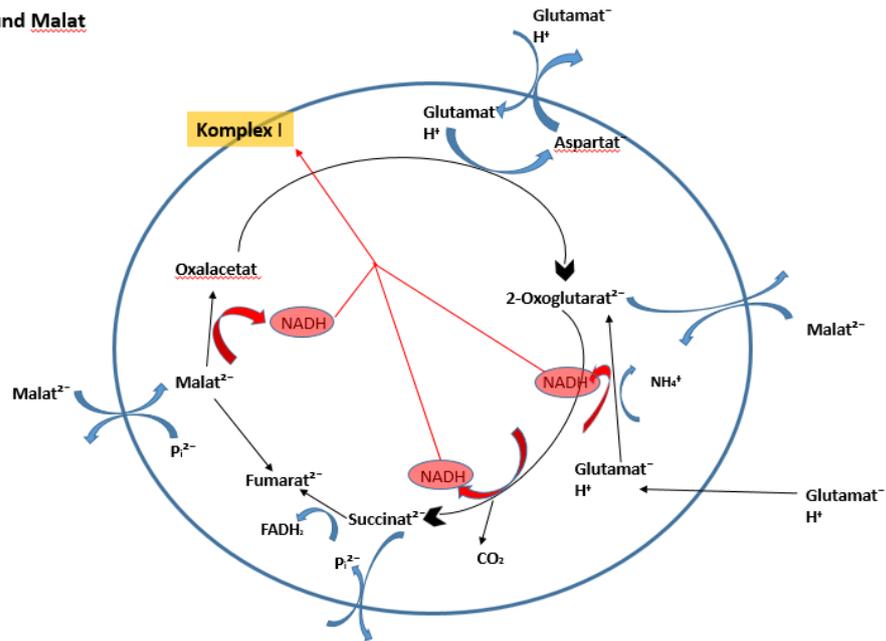


Abbildung 6: Mitochondriale Reaktionswege zu Komplex I über Malat und Glutamat. Die Skizze wurde erstellt in Anlehnung an: [20]

NADH: Nicotinamidadenindinukleotid – reduziert, FADH₂: Flavin-Adenin-Dinukleotid – reduziert, H⁺: Proton, Pi: organisches Phosphat, CO₂: Kohlenstoffdioxid, NH₄⁺: reduziertes Ammoniak,

In dieser Versuchsreihe wurde den Zellen Pyruvat, Malat und Glutamat zugeführt. Die Zugabe von Pyruvat und Glutamat mit Malat stellt Reduktionsäquivalente für den Komplex I der Atmungskette über Pyruvat / AcetylCoA und über den Malat-Aspartat Shuttle zur Verfügung, sodass in den weiteren Schritten die maximale OXPHOS – Kapazität erreicht werden konnte.

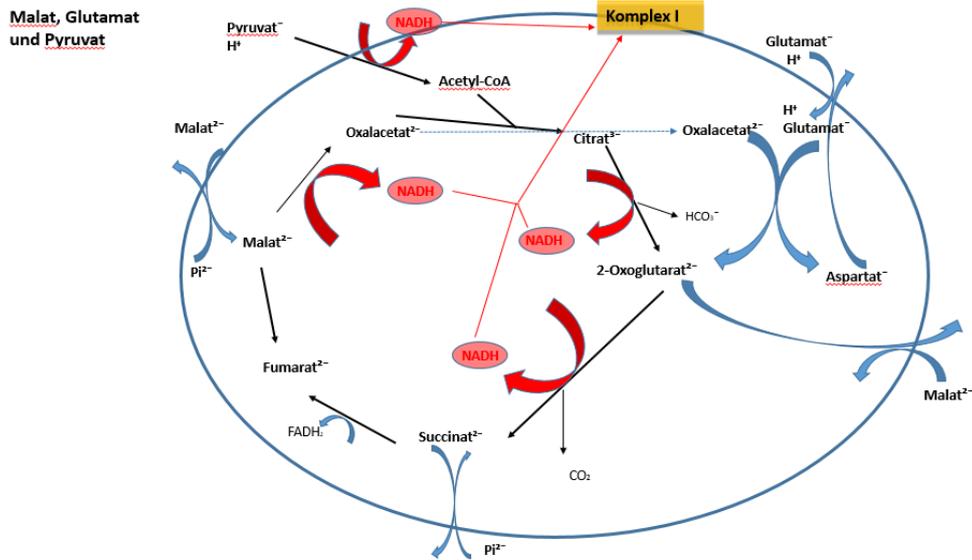


Abbildung 7: Mitochondriale Reaktionswege zu Komplex I über Pyruvat, Malat und Glutamat. Die Skizze wurde erstellt in Anlehnung an: [20]

NADH: Nicotinamadenindinukleotid – reduziert, FADH₂: Flavin-Adenin-Dinukleotid – reduziert, H⁺: Proton, Pi: organisches Phosphat, CO₂: Kohlenstoffdioxid, HCO₃⁻: Hydrogencarbonat

4. 5µl Cytochrom C (10µM)

Cytochrome zählen zu den sog. Hämproteinen, sie dienen unter anderem dem Elektronentransport in der Atmungskette. Cytochrom C dient der Elektronenübertragung von Komplex III auf Komplex IV. Bei Eukaryoten befindet sich das Cytochrom C in der inneren Mitochondrienmembran [36].

Ein Cytochrom C Mangel in den Zellen kann die respiratorische Kapazität limitieren. Es wurden 10 µM Cytochrom c hinzugegeben, um einen Cytochrom C Mangel als Ursache für eine verminderte OXPHOS Kapazität ausschließen zu können [20]. Zudem dient die Cytochrom C Zugabe als Test für die Intaktheit der äußeren Mitochondrienmembran. Ist die äußere Membran geschädigt wird durch Cytochrom C als Elektrontransportprotein ein elektrischer Fluss über die Mitochondrienmembran induziert. Dabei handelt es sich um einen ungekoppelten Elektronenfluss. Mit der Zugabe von Cytochrom C können also defekte Mitochondrien rekrutiert werden.

5. 20µlADP (5mM)

ADP gehört zu der Gruppe der Mononukleotide und enthält zwei über Anhydridbindungen verbundene energiereiche Phosphatreste. Es ist die Vorstufe für den Hauptenergiespeicher der Zellen, dem Adenosintriphosphat (ATP).

Durch die Zugabe von ADP kommt es zur Kopplung der exogenen mitochondrialen Atmung an den endogenen Prozess der oxidativen Phosphorylierung von ADP zu ATP. Es findet eine Energietransformation statt: der durch die Atmungskette aufgebaute Protonengradient bzw. elektrische Gradient stellt die Energie für die oxidative Phosphorylierung durch die ATP Synthase zur Verfügung. Mit der Zugabe von ADP wurde also ein gekoppeltes Stadium erreicht und es konnte nun die OXPHOS-Kapazität der Komplexes I abgelesen werden [19].

6. 20µlSuccinat(10mM)

Succinat ist ein Produkt des Citratzyklus. Es dient als Substrat des Komplexes II der Atmungskette, wobei es zu Fumarat oxidiert wird und als Reduktionsäquivalent FADH_2 entsteht. Es ist jedoch zu beachten, dass bei der Redoxreaktion der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) keine Protonen in den mitochondrialen Intermembranraum abgegeben werden. Die Malatdehydrogenase produziert aus Malat Oxalacetat (s.o.). Oxalacetat kann nicht durch die innere Mitochondrienmembran permeieren und akkumuliert daher im Intermembranraum. Es ist ein sehr potenter Inhibitor der Succinatdehydrogenase (Komplex II). Es wurde in der vorliegenden Versuchsreihe daher Succinat erst nach ADP hinzugegeben, da durch Zugabe von ADP bereits das ganze Oxalacetat durch die Kopplung der Atmungskette an die ATP-Synthase direkt über den Komplex I abgezogen wird. Zu beachten ist, dass erst nach Zugabe von Succinat die ganze Atmungskette inklusive Komplex II dargestellt wird.

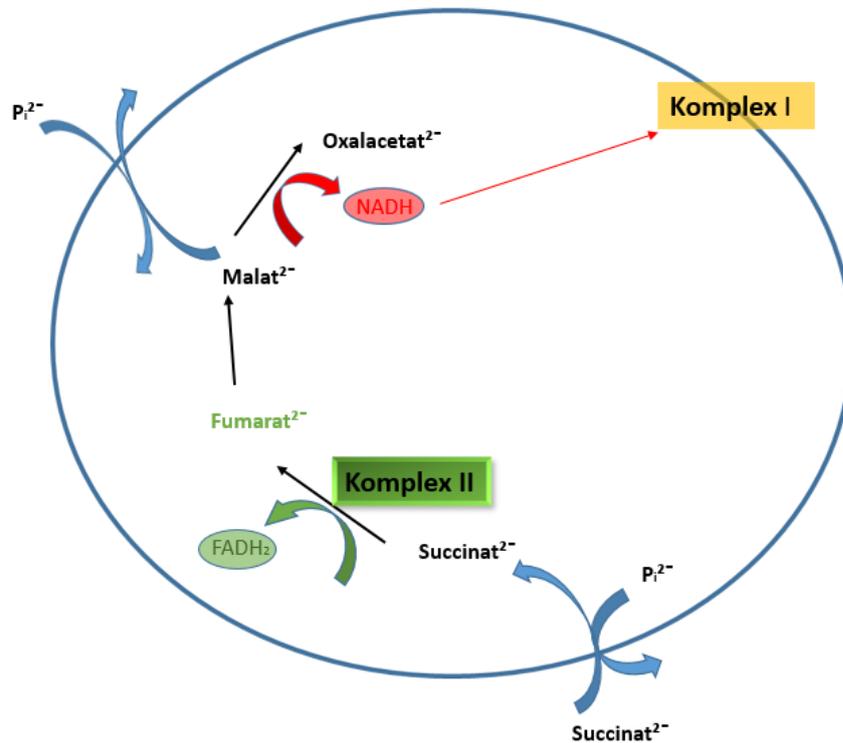


Abbildung 8: Mitochondriale Reaktionswege zu Komplex II über Succinat. Die Skizze wurde erstellt in Anlehnung an: [20]

NADH: Nicotinamidadenindinukleotid – reduziert, FADH₂: Flavin-Adenin-Dinukleotid – reduziert, H⁺: Proton, Pi: organisches Phosphat

Mit Zugabe von Succinat arbeiten nun alle Komplexe maximal, es kann in dieser Phase des Versuches nun die OXPHOS Kapazität der gesamten Atmungskette abgelesen werden. Diese Gesamtkapazität wird im Verlauf der Arbeit als die „OXPHOS“ Kapazität bezeichnet.

7. 5µl Rotenon (0,5µM)

Rotenon ist ein natürlich vorkommendes komplexes Keton, das aus den Wurzeln der Lonchocarpus Spezies gewonnen wird. Es handelt sich um einen klassischen Komplex I Inhibitor mit sehr hoher Affinität zu diesem Komplex. Da Rotenon sehr lipophile Eigenschaften besitzt, kann es ohne spezifische Transporter Zell- und Plasmamembranen überwinden. Es akkumuliert daher schnell in Zellorganellen, wie auch in den Mitochondrien [2, 55]. Durch

Ausschaltung von Komplex I mittels Rotenon, beschrieb das nachfolgende Plateau also die respirometrische Aktivität von Komplex II.

8. 1µl Antimycin A (5µM)

Bei Antimycin A handelt es sich um eine hydrophobe Substanz, die in der Regel in alkoholischer Lösung zu den Mitochondrien hinzugefügt wird. Die stark hemmende Wirkung von Antimycin A auf die mitochondriale Atmungskette wurde zuerst 1950 von Ahmad et al beschrieben [1]. Es wurde gezeigt, dass diese Substanz eine hemmende Wirkung auf den Komplex III hat. Keilin und Hartree lokalisierten 1955 die Angriffsstelle von Antimycin A zwischen den Strukturproteinen Cytochrom b und c1 des Komplexes III [32, 51]. Nach Hinzugabe von Antimycin A arbeitete nun nur noch Komplex IV.

In der nachfolgenden Abbildung 10 wird die Kurve der Sauerstoffdurchflussrate pro Zelle (JO_2) während der Zugabe der soeben aufgelisteten Substanzen gezeigt.

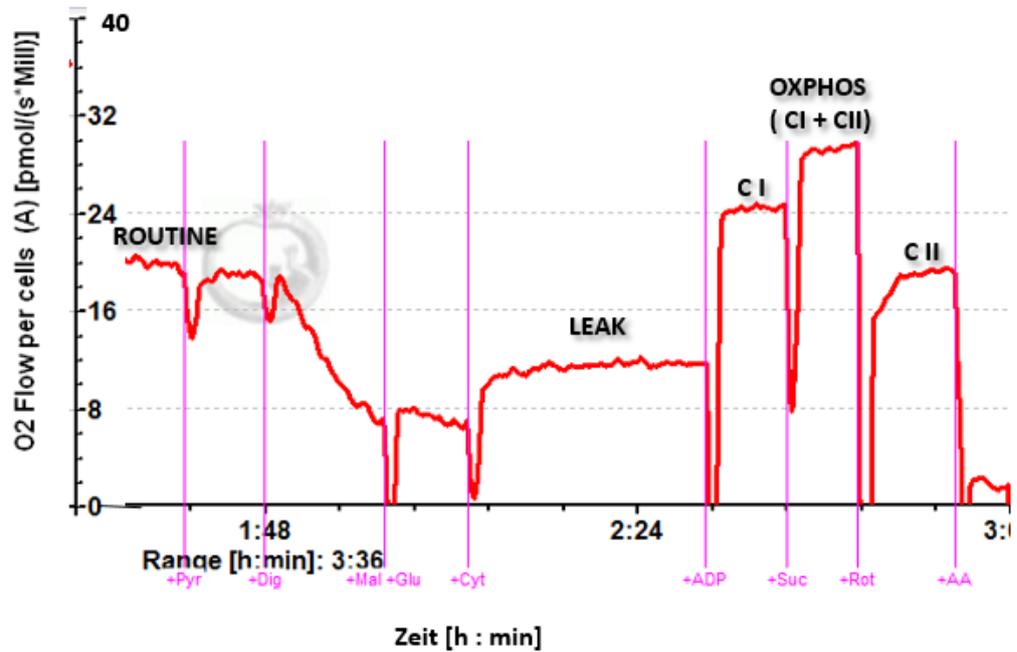


Abbildung 9: Kurve der ermittelten Sauerstoffdurchflussrate (JO_2) pro Zelle während des Titrationsversuches mit Bezeichnung der Stadien und der aktiven Komplexe. Die Kurve wurde im Versuch erstellt mittels des Programmes DatLab Software, Version 4.3.

ROUTINE: Routine – Stadium bei substratlimitierter Respiration

LEAK: Leak-Stadium bei ungekoppelter, nicht phosphorylierender Atmungsaktivität

C I: respiratorische Kapazität des Komplexes I

OXPHOS: respiratorische Gesamtkapazität

C II: respiratorische Kapazität des Komplexes II

Pyr: Pyruvat, Dig: Digitonin, Mal: Malat, Glu: Glutamat, Cyt: Cytochrom C, ADP: Adenosindiphosphat, Suc:

Succinat, Rot: Rotenon, AA: Antimycin A,

Einheit: O2 Flow per cells: Sauerstoffdurchflussrate pro Zelle (JO_2), pmol: picco mol, s: Sekunde, Milli: Millionen Zellen.

In vivo wird die Zellatmung abhängig von der körperlichen Aktivität reguliert. Unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen ist die Aktivität der Atmungskette von anderen Faktoren abhängig. Wenn sich die Zellen, wie zu Beginn des Versuches, in Zellmedium befinden, welches keine organischen Substrate für den Zellmetabolismus enthält, können sie

nur endogene Substrate verwerten. Sie pendeln sich in ihrer respiratorischen Aktivität in das sogenannte ROUTINE Level ein [19].

Auf das ROUTINE – Stadium folgt, nach der Substratzugabe für den Komplex I und Cytochrom C Zugabe, das sogenannte LEAK-Stadium. Das LEAK Stadium zeigt die ungekoppelte, nicht phosphorylierende Atmungsaktivität in den Zellen an. Es ist ein Maß für die Intaktheit der Mitochondrien. Ein Anstieg der respiratorischen Aktivität nach der Zugabe des Elektronentransportproteins Cytochrom C, würde einen Hinweis auf eine hohe ungekoppelte Elektronentransferkapazität geben. Dies wäre ein Indiz auf geschädigte, funktionsuntüchtige Mitochondrien, die ihr Membranpotential nicht konstant halten können.

Durch ADP Zugabe kommt es zum Übergang vom ungekoppelten LEAK Stadium in ein an die Phosphorylierung gekoppeltes Stadium. Es kann nun die respiratorische Kapazität des Komplexes I abgelesen werden.

Die OXPHOS-Kapazität kann nach Zugabe von Succinat bestimmt werden. Diese entspricht der maximalen gemeinsamen Aktivität von Komplex I und II.

Nach Hemmung von Komplex I mittels Rotenon kann die respiratorische Kapazität des Komplexes II abgelesen werden.

Die nachfolgende Abbildung 11 zeigt die Kurve der Sauerstoffkonzentration in der Kammer während der Zugabe der oben gelisteten Substanzen.

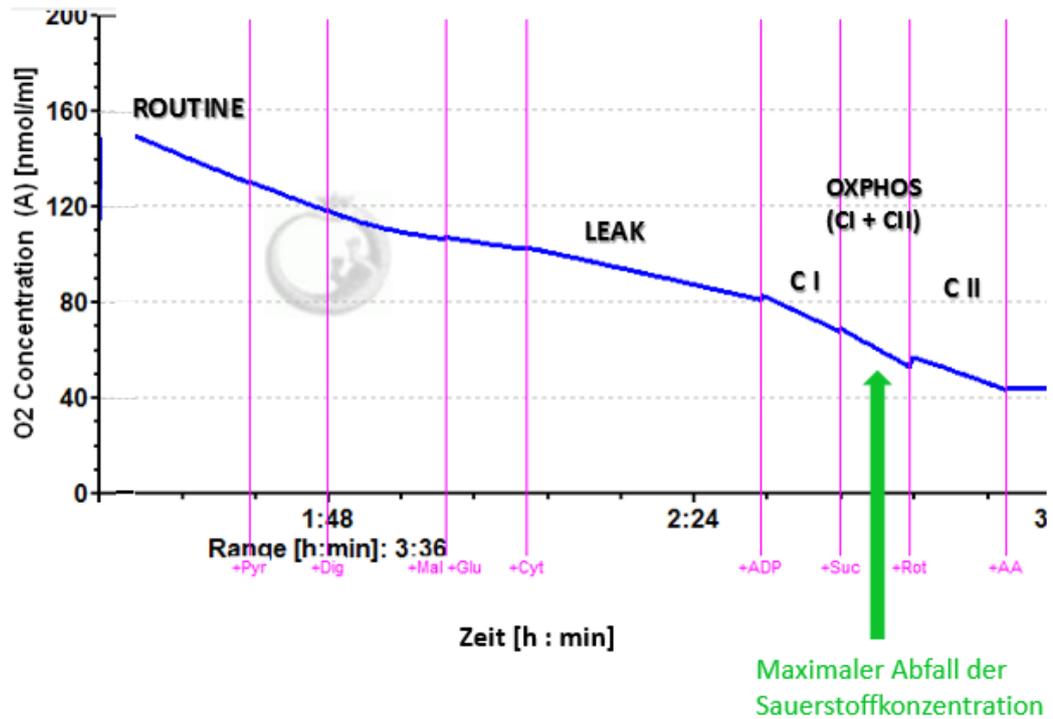


Abbildung 10 : Kurve der gemessenen Sauerstoffkonzentration in der Kammer während des Titrationsversuches mit Bezeichnung der Stadien und der aktiven Komplexe. Die Kurve wurde im Versuch erstellt mittels des Programmes Dat-Lab Software, Version 4.3.

ROUTINE: Sauerstoffkonzentration im Routine – Stadium bei substratlimitierter Respiration.

LEAK: Sauerstoffkonzentration im Leak-Stadium bei ungekoppelter, nicht phosphorylierender Atmungsaktivität

C I: Sauerstoffkonzentration bei aktivierten Komplex I

OXPHOS: Sauerstoffkonzentration bei maximaler OXPPOS-Kapazität

C II: Sauerstoffkonzentration bei aktivierten Komplex II

Pyr: Pyruvat, Dig: Digitonin, Mal: Malat, Glu: Glutamat, Cyt: Cytochrom C, ADP: Adenosindiphosphat, Suc: Succinat, Rot: Rotenon, AA: Antimycin A

Einheit: O2 Concentration: Sauerstoffkonzentration in Nanomol (nmol) pro Milliliter (ml)

Die Sauerstoffkonzentration nimmt im Stadium des ROUTINE Levels, auf Grund der endogenen Grundaktivität der Zellen, leicht ab. Auch im LEAK Stadium wird Sauerstoff verbraucht, was weiterhin zu einer leichten Abnahme der Sauerstoffkonzentration über die Zeit führt. Mit Aktivierung der respiratorischen Aktivität durch ADP-Zugabe steigt die Abnahme der Sauerstoffkonzentration an, die Kurve wird steiler. Durch Succinatzugabe und Erreichen der maximalen OXPPOS-Kapazität, erreicht auch die Geschwindigkeit des Sauerstoffkonzentrationsabfalles ein Maximum. Die Kurve fällt in diesem Abschnitt am steilsten (siehe grüner Pfeil Abbildung).

2.3.9. *Respirometrische Messung – Komplex IV Aktivität und Autooxidation*

9. 5µl Ascorbat (2mM) plus 5µl TMPD (0,5mM):

Die Zugabe von TMPD und Ascorbat ermöglicht die Analyse des chemischen, sogenannten „Background“ Sauerstoffverbrauches.

Einige Substrate und Bestandteile des Respirationsmediums werden bereits durch molekularen Sauerstoff oxidiert, wenn dieser zu Wasser gespalten wird. Diese sogenannte Autoxidation läuft im Hintergrund ab und ist von experimentellen Begebenheiten wie der Temperatur, der chemischen Zusammensetzung und dem pH des Respirationsmediums sowie von der Sauerstoffkonzentration in der Kammer abhängig. Zudem wird die Rate der Autoxidation durch Proteine, die Metalle enthalten katalysiert. In diesem Versuch ist das eisenhaltige Cytochrom c, das unter Punkt 4 hinzugefügt wurde, ein Enzym mit solch einer katalysierenden Funktion [35].

TMPD wird in respirometrischen Messungen häufig zur Analyse der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) Aktivität herangezogen. Hierbei dient TMPD als ein künstlicher Elektronendonator. TMPD wird jedoch schnell durch molekularen Sauerstoff oxidiert unter Bildung von radikalen Kationen mit außergewöhnlicher Stabilität (Wurster's Blue). Daher wird zusätzlich Ascorbat, das Salz der Ascorbinsäure hinzugefügt, um reduziertes TMPD durch H⁺ Aufnahme zu regenerieren. Zu beachten ist, dass die Autoxidation von TMPD begleitet wird von der Bildung von Superoxidradikalen und von Wasserstoffperoxidbildung. Diese Vorgänge werden durch Kupferionen und durch eisen- oder kupferhaltige Proteine, wie in diesem Versuch Cytochrom c, verstärkt [35].

2.3.9.1. Berechnung der Komplex IV Aktivität unter Berücksichtigung der Autoxidation

Die chemische, sogenannte „Background- Sauerstoffdurchflussrate“, also die chemische Autoxidation kann bei hohen Umgebungssauerstoffkonzentrationen als lineare Funktion dargestellt werden. Kuznetsov und Gaigner zeigten 2010, dass bei jeglicher Cytochrom c Konzentration und ausreichend hohem Umgebungssauerstoff eine lineare Beziehung zur Errechnung der Autoxidation gilt. In diesem Abschnitt des Versuches wird durch die Zugabe von TMPD und Ascorbat also eine lineare Autoxidation herbeigeführt [35].

10. 50µl Natriumsulfid (Na₂S) (50µM)

Um zwischen der Zellatmung und der Autoxidation von TMPD, Ascorbat und Komplex IV unterscheiden zu können, wird nun zunächst die Komplex IV Aktivität durch Natriumsulfidzugabe gehemmt. Es ist in diesem Endstadium des Versuches also die gesamte Atmungskette stillgelegt. Nach der Zugabe von Na₂S wird respirometrisch also nur noch die Autoxidation dargestellt.

Um die lineare Beziehung der Autoxidation aus dem Versuch erschließen zu können werden nun drei Punkte auf der Kurve der Sauerstoffdurchflussrate (JO₂) nach Hinzufügen von Natriumsulfid bestimmt. Danach werden die Kammern mit Raumluft geflutet um eine Reoxygenierung zu erreichen. Die Reoxygenierung ist in diesem Versuchsstadium notwendig, da die Autoxidation sauerstoffabhängig ist. Um einen aussagekräftigen Wert für die Autoxidation zu erlangen, werden daher nach der Reoxygenierung weitere drei Punkte auf der Kurve der Sauerstoffdurchflussrate (JO₂) ausgewählt. Durch diese sechs gewählten Punkte der JO₂ kann nun mithilfe des Programmes Microsoft Excel 2013 eine Kurve gelegt und anhand dieser eine lineare Funktion bestimmt werden. Mit Hilfe dieser linearen Funktion lässt sich die Autoxidation von TMPD errechnen. Ein Beispiel zur Errechnung der Autoxidation und der sich daraus erschließenden Komplex IV Aktivität zeigt die folgende Abbildung.

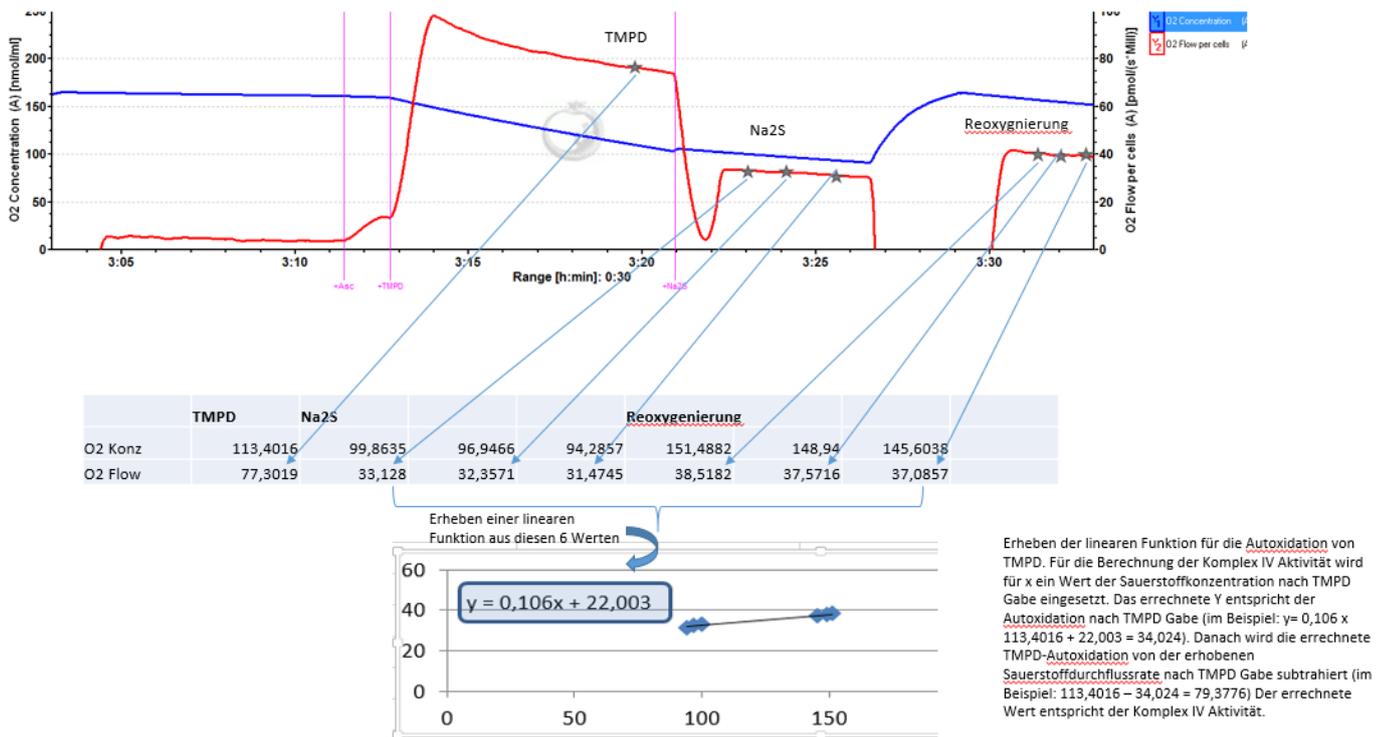


Abbildung 11: Schematische Erklärung zur Berechnung der Komplex IV Aktivität. Erstellung der Kurve durch DatLab Software, Version 4.3. Tabellarische Darstellung der erhobenen Werte in Tabellenform und Berechnung der Autoxidation mittels Excel 2013. Gesamtbilderhebung in eigener Produktion mittels Microsoft Power Point 2013.

Einheit: O2 Concentration: Sauerstoffkonzentration in Nanomol (nmol) pro Milliliter (ml); O2 Flow per cells: Sauerstoffdurchflussrate pro Zelle (JO₂), pmol: picco mol, s: Sekunde, Mill: Millionen Zellen,

TMPD: Tetramethylphenylendiamin, Na₂S: Natriumsulfid, h: Stunden, min: Minuten

2.3.10. Auswertung und Berechnungen der Versuchsergebnisse

Es wurden nach Zugabe jedes Substrates die Sauerstoffdurchflussrate und die Sauerstoffkonzentration abgelesen, und diese dem dazugehörigen Stadium bzw. dem jeweils aktiven Komplex zugeordnet. Diese Daten wurden mit Hilfe des Programmes Excel 2007 gelistet. Zudem wurden hierbei die Summe der Einzelkapazitäten von Komplex I und II (CI + CII), die relative OXPHOS – Kapazität (OXPHOS%) und die Respiratorische Control Ratio (RCR) berechnet.

2.3.10.1. Berechnung der relativen OXPHOS – Kapazität (OXPHOS%)

$$OXPHOS\% = [JO_2Oxphos / (JO_2CI + JO_2CII)] \times 100.$$

Es werden also die Komplexe I und II, wenn sie zusammenarbeiten, ins Verhältnis zu den isoliert arbeitenden und dann addierten Komplexaktivitäten gesetzt. Sinkt dieses Verhältnis unter einen gewissen Prozentsatz, kann davon ausgegangen werden, dass ein Problem des Elektronenabflusses über den Ubiquinon-Pool vorliegt. Ein Verhältnis von 80% ist regelhaft, liegt es unter 60% weist dies auf ein Problem des Elektronenflusses nach Komplex I und II hin.

2.3.10.2. Berechnung der Respiratorischen Control Ratio, RCR

RCR= Sauerstoffdurchflussrate nach ADP-Aktivierung / Sauerstoffdurchflussrate im LEAK Stadium, also in unserer Versuchsreihe nach der Gabe von Cytochrom C.

Die RCR stellt ein Maß für den Kopplungsgrad der mitochondrialen Atmung dar. Je größer die Kopplung an die oxidative Phosphorylierung von ADP, desto größer ist der errechnete Wert der RCR.

Ungeachtet dessen, ob ein ungekoppeltes Stadium vorliegt oder nicht, die OXPHOS Kapazität, und damit die RCR werden kleiner, wenn eine geringe Kapazität des Phosphorylierungssystems die OXPHOS-Kapazität limitiert. Das ist der Fall, wenn der ungekoppelte Elektronenfluss, ein Maß der Kapazität des Elektronen-Transfer-Systems (ETS), größer ist als der an die oxidative Phosphorylierung gekoppelte Elektronenfluss (P). Die ETS Kapazität überschreitet dann die OXPHOS Kapazität. Das Referenzstadium, welches verwendet wird, um den Kopplungsgrad in den Zellen anzuzeigen ist nicht die gekoppelte OXPHOS Kapazität (P), sondern das Stadium, welches sich für die nicht gekoppelte Elektronentransferkapazität (ETS) ergibt. Die RCR kann Werte zwischen 1 und Unendlich annehmen. (Erich Gnaiger, 2011b). Berechnung: $RCR = JO_2 \text{Komplex I} / JO_2 \text{Cytochrom C}$

Des Weiteren wurden in der Excel Tabelle der Median, die 25 und 75 % Perzentile, sowie das Maximum und Minimum bestimmt.

2.3.11. Statistische Analyse

Mit Hilfe der Software Graph Pad Prism 06 wurde mit den in der Excel Tabelle gelisteten Daten die statistische Analyse durchgeführt.

Es wurde der Kruskal-Wallis Test angewandt. Dabei wurden die Kontroll-, die 24 Stunden Hyperoxie- und die Interventionsgruppe einer Zellreihe zunächst in ihrer Gesamtheit mittels des ANOVA Testes auf Signifikanz überprüft. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ gewählt. Konnte im ANOVA Test ein signifikantes Ergebnis festgestellt werden, wurde mittels des Multiple comparison Testes eine post hoc Analyse durchgeführt, welche die Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen einer Zellreihe untersucht.

Die im Ergebnisteil der Arbeit dargestellten Dotplots wurden, nach dieser statistischen Testung, ebenfalls mit dem Programm Graph Pad Prism 06 konstruiert.

3. Ergebnisse

3.1. Komplex I

In der Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Sauerstoffdurchflussrate nach Aktivierung des Komplexes I mit ADP dargestellt. Für beide Zellreihen wurden jeweils die Kontrollgruppe, die 24 Stunden Hyperoxie- und die Interventionsgruppe gegenübergestellt und statistisch miteinander verglichen. Die Abbildung zeigt, dass es bei den Alveolarmakrophagen (LAM) unter Sauerstoffexposition zu einer deutlichen Verminderung der Komplex I Aktivität kommt. Wobei sich ein signifikanter Unterschied im ANOVA Test der LAMs ($p=0,0004$) einstellt. In der Post hoc Analyse kann mit Hilfe des Dunn's multiple comparison Testes ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe nachgewiesen werden

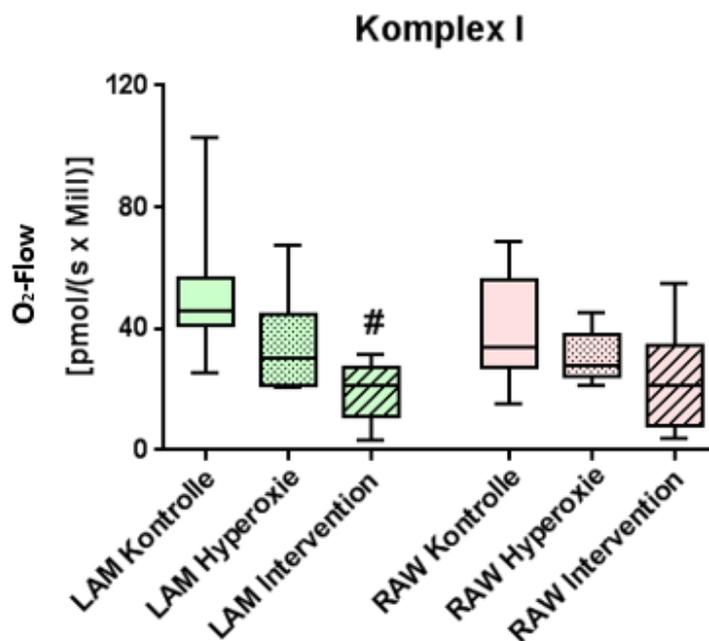


Abbildung 12: respiratorische Kapazität des Komplexes I der Kontroll-, Hyperoxie und Interventionsgruppe
Einheit: O₂ Flow per cells: Sauerstoffdurchflussrate pro Zelle (JO₂), pmol: picco mol, s: Sekunde, Mill: Millionen Zellen

LAM: Lung alveolar macrophages, RAW: RAW 264.7 Makrophagen

Kontrolle: Kultivierung der Zellen bei Raumluft, Hyperoxie: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂, Intervention: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, zwei Stunden 95% O₂, 5% CO₂, acht Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂

Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie das Minimum und Maximum.

#: signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe, $p=0,0004$

3.2. OXPPOS

Die Ergebnisse der respirometrischen Kapazität nach ADP und Succinatzugabe sind in Abbildung 14 dargestellt. Sie stellen die OXPPOS Kapazität, also die respirometrische Kapazität nach maximaler Aktivierung aller Komplexe der Atmungskette dar. Auch hier ist eine Signifikanz in der LAM-Gruppe im ANOVA Test ($p=0,0014$) zu verzeichnen. In der post hoc Analyse mittels Dunn's multiple comparison Test stellt sich diese Signifikanz zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe dar. Bei den Alveolarmakrophagen ist in der Interventionsgruppe in der OXPPOS –Analyse eine deutliche Verminderung der respiratorischen Aktivität zu vermerken. In der Gruppe der RAW Makrophagen wurde kein signifikanter Unterschied in der OXPPOS Kapazität zwischen Kontroll-, Hyperoxie- und Interventionsgruppe festgestellt.

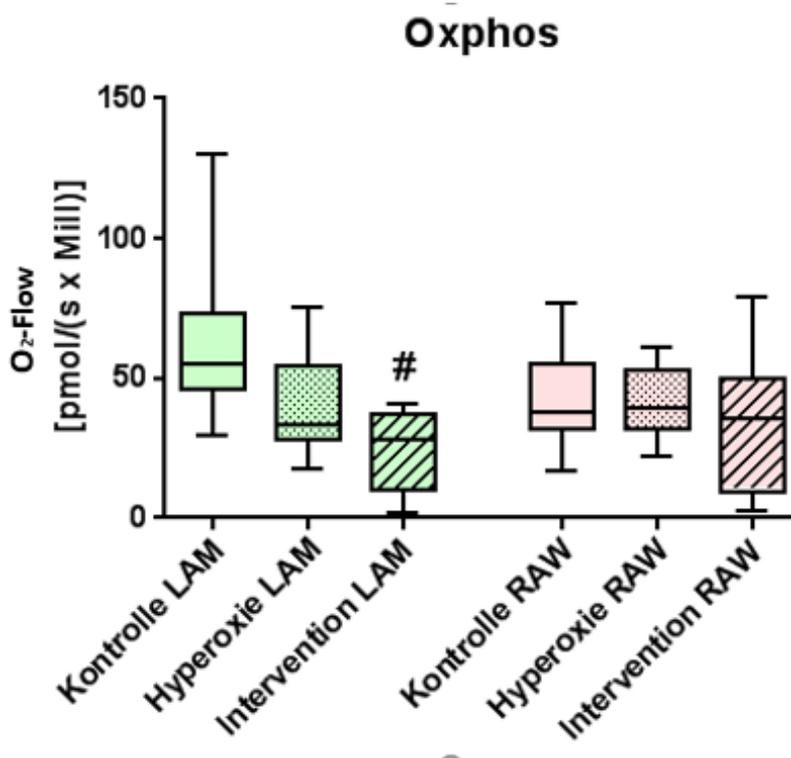


Abbildung 13: OXPPOS – Kapazität der Kontroll-, Hyperoxie- und Interventionsgruppe

Einheit: O₂ Flow per cells: Sauerstoffdurchflussrate pro Zelle (JO₂), pmol: picco mol, s: Sekunde, Mill: Millionen Zellen

LAM: Lung alveolar macrophages, RAW: RAW 264.7 Makrophagen

Kontrolle: Kultivierung der Zellen bei Raumluft, Hyperoxie: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂, Intervention: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, zwei Stunden 95% O₂, 5% CO₂, acht Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂

Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie das Minimum und Maximum

#: signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe, $p=0,0014$

3.3. Komplex II

Auch bei isolierter Betrachtung des Komplexes II, nach Zugabe von Rotenon, kann im ANOVA Test in der Gruppe der Alveolarmakrophagen (LAM) eine Signifikanz gezeigt werden ($p=0,0014$). Hierbei zeigt sich in der post hoc Analyse mit Hilfe des Dunn's multiple comparison Testes eine Signifikanz zwischen der Hyperoxie- und der Kontrollgruppe, sowie zwischen der Interventions- und der Kontrollgruppe. Das bedeutet, dass sowohl in der Hyperoxiegruppe, als auch in der Interventionsgruppe die Komplex II Kapazität gegenüber der Kontrollgruppe in einem signifikanten Ausmaß abnimmt. In der Gruppe der RAW –Makrophagen ist das nicht der Fall. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

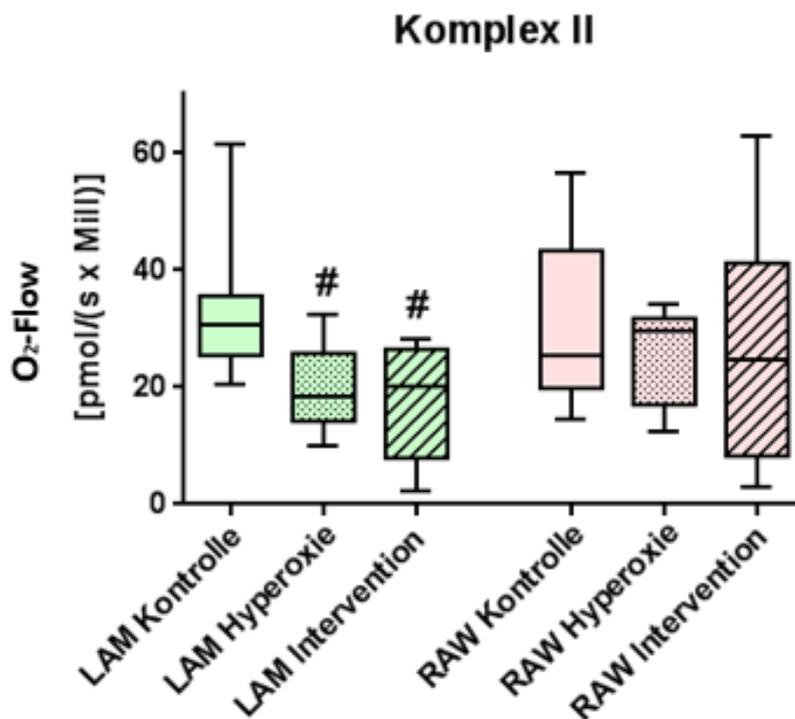


Abbildung 14: respiratorische Kapazität des Komplexes II der Kontroll-, Hyperoxie und Interventionsgruppe
Einheit: O₂ Flow per cells: Sauerstoffdurchflussrate pro Zelle (JO₂), pmol: picco mol, s: Sekunde, Mill: Millionen Zellen

LAM: Lung alveolar macrophages, RAW: RAW 264.7 Makrophagen

Kontrolle: Kultivierung der Zellen bei Raumluft, Hyperoxie: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂, Intervention: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, zwei Stunden 95% O₂, 5% CO₂, acht Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂

Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie das Minimum und Maximum

#: signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe, $p=0,0014$

3.4. Komplex I + II

Bei der Addition der respirometrischen Kapazitäten von Komplex I und II, ist diese im ANOVA Test mit einem p-Wert von 0,0012 für die LAM-Zellreihe signifikant. Die Post hoc Analyse mittels Dunn's multiple comparison Testes ergibt hierbei einen signifikanten Unterschied zwischen der Hyperoxie- und der Kontrollgruppe sowie zwischen der Interventions- und der Kontrollgruppe. Wie nach den bereits dargestellten Ergebnissen zu erwarten, ist die Summe der respiratorischen Kapazitäten aus Komplex I und II in der Hyperoxie- und Interventionsgruppe der LAMs signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. In der Zellreihe der RAW – Makrophagen ist auch hier kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Diese Ergebnisse sind im Diagramm der Abbildung 16 aufgezeigt.

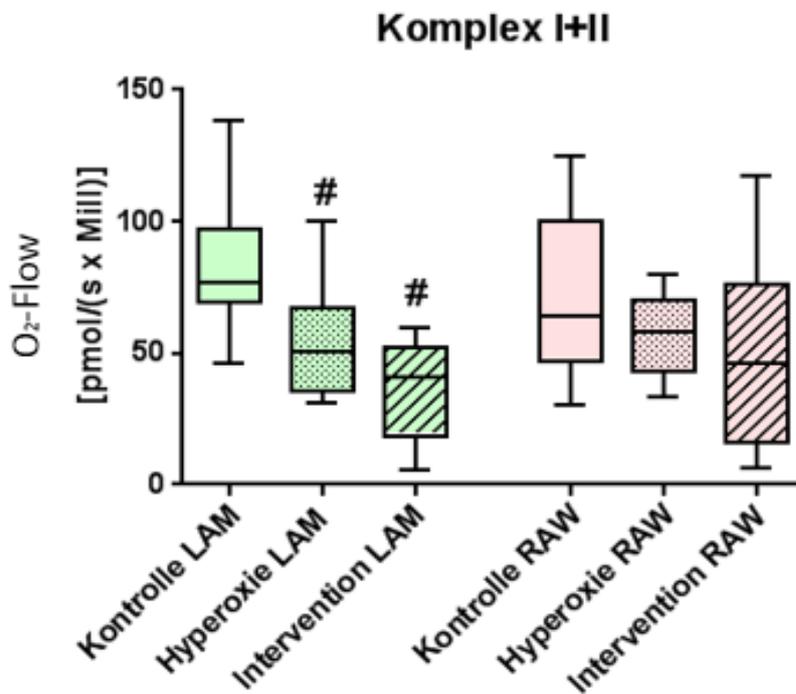


Abbildung 15: respiratorische Kapazität des Komplexes I plus Komplex II der Kontroll-, Hyperoxie und Interventionsgruppe

Einheit: O₂ Flow per cells: Sauerstoffdurchflussrate pro Zelle (JO₂), pmol: picco mol, s: Sekunde, Mill: Millionen Zellen

LAM: Lung alveolar macrophages, RAW: RAW 264.7 Makrophagen

Kontrolle: Kultivierung der Zellen bei Raumluft, Hyperoxie: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂, Intervention: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, zwei Stunden 95% O₂, 5% CO₂, acht Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂

Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie das Minimum und Maximum

#: signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe, $p=0,0012$

3.5. Komplex IV

In der Abbildung 17 sind die errechneten Ergebnisse der Komplex IV Aktivität dargestellt. Für beide Zellreihen ist für die Komplex IV Aktivität kein signifikanter Unterschied nachweisbar. Die Komplex IV Aktivität nimmt bei hyperoxygenen Bedingungen nicht in signifikanter Weise ab.

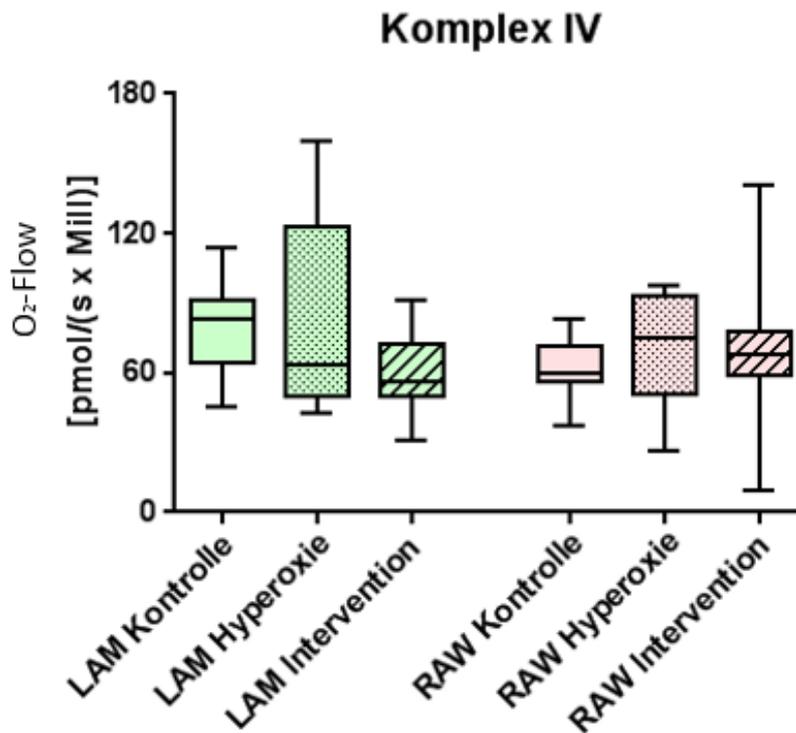


Abbildung 16: errechnete respiratorische Kapazität des Komplexes IV der Kontroll-, Hyperoxie und Interventionsgruppe

Einheit: O₂ Flow per cells: Sauerstoffdurchflussrate pro Zelle (JO₂), pmol: picco mol, s: Sekunde, Mill: Millionen Zellen

LAM: Lung alveolar macrophages, RAW: RAW 264.7 Makrophagen

Kontrolle: Kultivierung der Zellen bei Raumluft, Hyperoxie: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂, Intervention: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, zwei Stunden 95% O₂, 5% CO₂, acht Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂

Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie das Minimum und Maximum
kein signifikanter Unterschied

3.6. Relative OXPHOS – Kapazität (OXPHOS %)

Auch bei der errechneten relativen OXPHOS – Kapazität lässt sich sowohl bei den LAMs als auch bei den RAW Makrophagen keine Signifikanz feststellen. Die OXPHOS% nimmt in beiden Zellreihen unter hyperoxygenen Bedingungen kaum ab. Diese Ergebnisse werden in Abbildung 18 gezeigt.

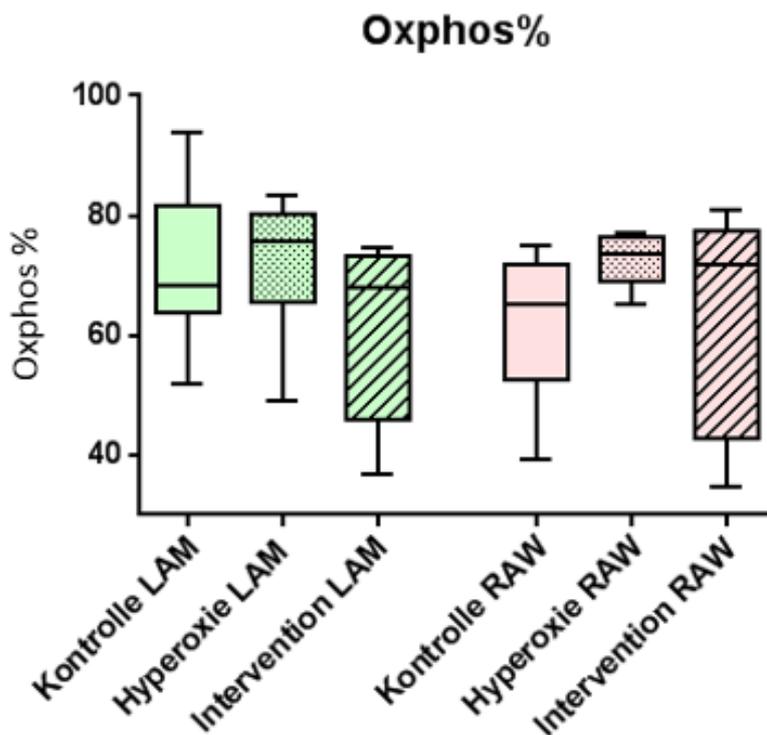


Abbildung 17: errechnete OXPHOS% der Kontroll-, Hyperoxie und Interventionsgruppe. OXPHOS%: relative OXPHOS-Kapazität.

Einheit: $OXPHOS\% = [JO_2 \text{ Oxphos} / (JO_2 \text{ CI} + JO_2 \text{ CII})] \times 100$

LAM: Lung alveolar macrophages, RAW: RAW 264.7 Makrophagen

Kontrolle: Kultivierung der Zellen bei Raumluft, Hyperoxie: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂, Intervention: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, zwei Stunden 95% O₂, 5% CO₂, acht Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂

Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie das Minimum und Maximum
kein signifikanter Unterschied

3.7. Respiratorische Control Ratio (RCR)

Abbildung 18 zeigt die Dotplots der errechneten Respiratorische Control Ratio. In beiden Zelllinien wurde hierbei keine Signifikanz festgestellt. Die RCR der Zellen unterscheidet sich bei hyperoxygenen Bedingungen nur wenig von der RCR der Zellen unter Kontrollbedingungen.

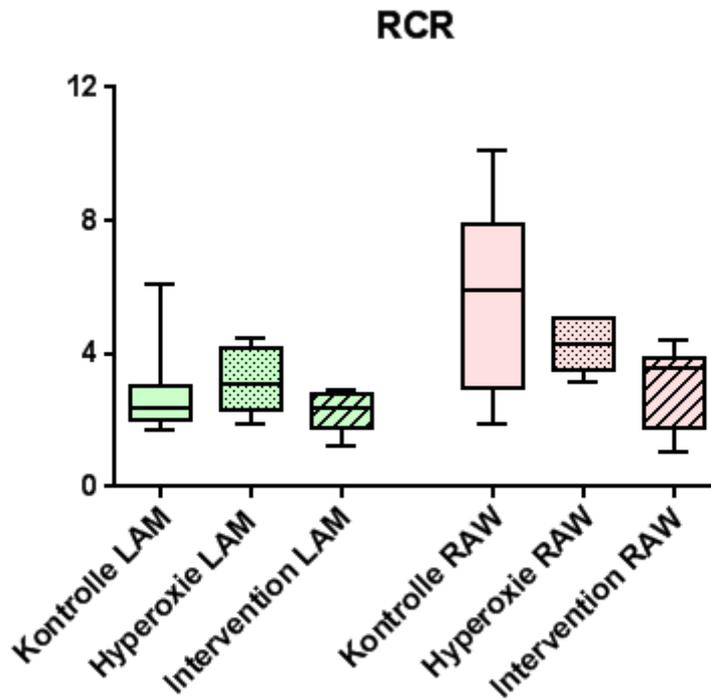


Abbildung 18: errechnete respiratorische Control Ratio (RCR) der Kontroll-, Hyperoxie und Interventionsgruppe.

Einheit: $RCR = \text{Sauerstoffdurchflussrate nach ADP-Aktivierung} / \text{Sauerstoffdurchflussrate im LEAK Stadium}$
($RCR = \text{JO}_2 \text{ Komplex I} / \text{JO}_2 \text{ Cytochrom C}$)

LAM: Lung alveolar macrophages, RAW: RAW 264.7 Makrophagen

Kontrolle: Kultivierung der Zellen bei Raumluft, Hyperoxie: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂, Intervention: Kultivierung bei 24 Stunden Raumluft, zwei Stunden 95% O₂, 5% CO₂, acht Stunden Raumluft, 24 Stunden 95% O₂, 5% CO₂

Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie das Minimum und Maximum
kein signifikanter Unterschied

3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei Betrachtung aller Ergebnisse lassen sich folgende Fakten zusammenfassen:

- Bei den RAW Makrophagen ist unter hyperoxygenen Bedingungen sowohl in der Hyperoxie- als auch in der Interventionsgruppe keine signifikante Abnahme der mitochondrialen respiratorischen Kapazität nachweisbar. Dies gilt sowohl für die respiratorische Gesamtkapazität (OXPHOS) als auch für die Kapazität der einzelnen Komplexe.
- Bei den Alveolarmakrophagen (LAMs) sind unter hyperoxygenen Bedingungen sowohl in der Hyperoxie- als auch in der Interventionsgruppe signifikante Abnahmen der respiratorischen Kapazitäten gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen:
 1. Eine signifikante Abnahme der Gesamtkapazität (OXPHOS) bei der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, $p= 0,0014$.
 2. Ein signifikanter Rückgang der Komplex I Aktivität der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, $p=0,0004$
 3. Eine signifikante Abnahme der Komplex II Aktivität sowohl in der Hyperoxiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch in der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, $p=0,0014$
 4. Ein signifikanter Rückgang der addierten Einzelaktivitäten von Komplex I und II. Sowohl bei der Hyperoxiegruppe als auch bei der Interventionsgruppe im jeweiligen Vergleich zur Kontrollgruppe, $p=0,0012$.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie sollte zum einen untersucht werden, ob Alveolarmakrophagen auf Grund ihrer Herkunft aus der Lunge, mit hyperoxygenen Bedingungen und den damit einhergehenden toxischen Sauerstoffradikalen besser zu Recht kommen als herkömmliche, ubiquitär im Körper vorkommende, Zellen. Zum anderen sollten die Adaptationsmechanismen der Zellen auf eine hyperoxygene Umgebung untersucht werden. Hierbei wurde untersucht, ob eine hyperbare Sauerstofftherapie von zwei Stunden die Nebenwirkungen der Hyperoxie reduzieren kann.

Entgegen unserer Erwartungen zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass die RAW-Makrophagen mit hyperoxygenen Bedingungen besser zu Recht kommen als die aus der Lunge stammenden Alveolarmakrophagen. Zudem zeigen die Ergebnisse deutlich, dass eine hyperbare Sauerstofftherapie von zwei Stunden den Schaden der darauffolgenden Hyperoxie in den Mitochondrien nicht verringern kann, es findet keine Adaptation statt. Somit haben sich die aufgestellten Hypothesen zu Beginn der Studie durch die Versuchsreihe nicht bestätigen lassen.

4.1.1. Diskussion der beiden Fragestellungen

In der vorliegenden Versuchsreihe konnten die Ergebnisse der vorangegangenen Hyperoxiestudien mit Alveolarmakrophagen (LAMs) [6] bestätigt werden: Unter hyperoxygenen Bedingungen nimmt die respiratorische OXPHOS Kapazität der LAMs deutlich ab.

Die erste Hypothese, dass eine 24 stündige Exposition in hyperoxygener Umgebung die Alveolarmakrophagen in einem geringeren Ausmaß schädigen und in ihrer respiratorischen Kapazität weniger beeinträchtigen würde als die RAW Makrophagen, konnte jedoch nicht bestätigt werden. In der Zellreihe der RAW Makrophagen konnte kein signifikanter Unterschied der OXPHOS - Kapazität zwischen der Kontroll –und der 24 Stunden Hyperoxiegruppe gefunden werden. Dies bedeutet, dass sich die RAW Makrophagen gegenüber hyperoxygenen Bedingungen sogar besser anpassen können als die Alveolarmakrophagen, obwohl diese, aus der Lunge stammenden Zellen, normalerweise höheren Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt sind [30].

Die zweite Hypothese, die im Rahmen dieser Studie aufgestellt wurde, stellte die Vermutung auf, dass bei einer zwei Stunden andauernden Sauerstofftherapie eine Adaptation gegenüber der schädigenden Wirkung der Radikale stattfinden, und daher die nachfolgende, 24 stündige Exposition gegenüber 95%igen Sauerstoff eine geringere Beeinträchtigung der mitochondrialen Gesamtaktivität mit sich bringen würde. Das heißt in der Interventionsgruppe wurde im Versuch eine höhere OXPHOS Kapazität bzw. mitochondriale Kapazität erwartet, im Vergleich zur 24 Stunden Hyperoxiegruppe. Diese Vermutung konnte jedoch in keiner der beiden Zellreihen bestätigt werden.

Bei den RAW Makrophagen blieb die mitochondriale Gesamtkapazität in der Interventionsgruppe sowohl im Vergleich zur Kontroll- als auch zur Hyperoxiegruppe recht stabil. Durch die Intervention konnte in dieser Zellreihe also weder eine Verbesserung noch eine Verschlechterung der mitochondrialen Aktivität verzeichnet werden.

Im Gegensatz dazu steht das Verhalten der Alveolarmakrophagen. Auch in dieser Zellreihe konnte durch die Intervention einer zwei stündigen Konditionierung gegenüber Sauerstoff keine Verbesserung der OXPHOS – Kapazität erreicht werden. Im Gegenteil, die respiratorische Aktivität in der Interventionsgruppe nahm sogar stärker ab als die Aktivität in der 24 Stunden Hyperoxiegruppe.

4.1.2. Diskussion der weiteführenden spezifischen Fragestellungen

Betrachtet man die Komplexe in isolierter Form lassen sich hierbei konkretere Aussagen über die Wirkung der Hyperoxie auf die Atmungskette aufstellen.

Wie bereits dargestellt, hat die Hyperoxie einen beeinträchtigenden Effekt auf die Gesamtkapazität der mitochondrialen Funktion in Alveolarmakrophagen (LAMs), während dies bei den RAW-Makrophagen nicht zu beobachten ist. Auch in den isoliert betrachteten Komplexen der RAW Makrophagen war keine signifikante Abnahme der einzelnen Komplexaktivitäten unter oxidativem Stress zu verzeichnen.

Bei den Alveolarmakrophagen zeigte sich in dieser Versuchsreihe, dass sich die verminderte respiratorische Kapazität vor allem auf die Aktivität des Komplexes I und II zurückführen lässt. Beide Komplexe arbeiten unter hyperoxygenen Bedingungen weniger effizient. Dies gilt sowohl in der 24 h Stunden Hyperoxiegruppe, als auch in der Interventionsgruppe. Die

Komplex IV Aktivität zeigte sich bei den respirometrischen Versuchen hingegen unter hyperoxygenen Bedingungen kaum beeinträchtigt. Komplex I und II scheinen daher am stärksten von der schädigenden Wirkung der reaktiven Sauerstoffspezies betroffen zu sein. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der berechneten relativen OXPHOS – Kapazität (OXPHOS%) bestätigt. Die relative OXPHOS – Kapazität ändert sich unter 95%iger Sauerstoffexposition kaum. Sie sinkt nicht unter einen gewissen Prozentsatz ab, daher liegt kein Problem im Elektronenfluss über den Ubiquinon-Pool vor. Es kann davon ausgegangen werden, dass die verminderte Elektronentransferkapazität vor dem Ubiquinon-Pool, im Komplex I und II, ihren Ursprung hat. Auch Zhao et al sahen in ihrer Studie an isolierten Mitochondrien aus *S_{o2}A* Fliegen (siehe Einleitung) vor allem einen Rückgang der Komplex I Aktivität unter hyperoxygenen Bedingungen [58]. Diese Beobachtung konnte in unserer Versuchsreihe bestätigt werden.

Auch die respiratorische Control Ratio (RCR) sinkt in beiden Zellreihen unter Sauerstoffexposition nicht in signifikanter Weise ab. Da die RCR ein Maß für den Kopplungsgrad darstellt, lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die Kopplung des Elektronenflusses an die oxidative Phosphorylierung unter oxidativem Stress wenig beeinträchtigt ist.

Die Frage, ob ein Komplex die Leistung unter hyperoxygenen Bedingungen steigert, um die verminderte Aktivität der anderen Komplexe zu kompensieren, lässt sich in dieser Studie eindeutig beantworten: in keiner der beiden Zellreihen kann ein Komplex seine Aktivität unter Hyperoxie steigern. Dies gilt auch für die Interventionsgruppe. Eine zweistündige Hyperoxieexposition ruft in keinen der isoliert betrachteten Komplexe einen Kompensationsmechanismus hervor, um der verminderten Aktivität der anderen Komplexe entgegenzuwirken.

4.2. Diskussion der Methode

Der OROBOROS Oxygraph – 2k für High Resolution Respirometrie stellt aktuell den Goldstandard für die präzise Messung der mitochondrialen respiratorischen Aktivität dar. Eine umfassende Anzahl an Studien und weitreichende Erfahrungen mit dem Oxygraphen haben zu standardisierten Versuchsprotokollen geführt, die eine sehr genaue Analyse der OXPHOS – Kapazität der Zellen ermöglicht [21]. Der Aufbau und Ablauf der einzelnen Versuche der vorliegenden Studie wurden in Anlehnung an diese standardisierten Protokolle

aufgestellt und praktiziert. Somit verfügen die Ergebnisse im Rahmen dieses standardisierten Verfahrens über eine hohe Aussagekraft und Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Studien der High Resolution Respirometrie.

Im Rahmen der Diskussion der Methodik dieser Studie sollten die hier verwendeten Zellen und die Umgebungsbedingungen, in denen sie kultiviert wurden, genauer betrachtet werden. Dabei ist zunächst anzumerken, dass es sich bei beiden Zellreihen um solche handelt, die bereits vor Jahrzehnten aus ihrem Ursprungsorganismus isoliert wurden, um dann unter experimentellen Laborbedingungen weiter kultiviert zu werden [43, 48]. Es handelt sich also um immortalisierte Zellen, die sich von in vivo vorkommenden Zellen unterscheiden. Man muss davon ausgehen, dass sich die Zellen den Laborbedingungen angepasst und bereits Adaptationsmechanismen entwickelt haben. Die in dieser Versuchsreihe verwendeten Zellen unterscheiden sich in ihrem Verhalten gegenüber hyperoxygenen Bedingungen sicherlich von direkt aus dem menschlichen Körper stammenden Zellen, denn in der Raumluft, in der sie kultiviert wurden, herrscht bereits ein höherer Sauerstoffpartialdruck als im menschlichen Körper. Streng genommen ist die Kontrollgruppe dieser Studie also bereits einer gewissen Hyperoxie ausgesetzt, da der Sauerstoffpartialdruck der Luft etwa 150mmHg beträgt und damit über dem üblichen, im Gewebe vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck liegt [29, 30]. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Zellen eine gewisse Hyperoxie, wie sie unter Raumluftbedingungen vorherrscht, gewöhnt sind und Adaptationsmechanismen gegenüber oxidativen Stress über die Zeit entwickelt haben. In diesem Zusammenhang sollte daher angemerkt werden, dass die in der Studie erhobenen Versuchsergebnisse nicht direkt auf in vivo Zellen des menschlichen Körpers übertragen werden können. Jedoch handelt es sich bei den hier verwendeten Zelllinien um solche, die weltweit in vielen experimentellen Arbeiten Verwendung gefunden und sich als durchaus aussagekräftiges Modell für die mitochondriale Forschung erwiesen haben. Daher lassen sich die hier erhobenen Ergebnisse sehr gut mit anderen experimentellen Aussagen der Hyperoxieforschung vergleichen und analysieren. [23, 28, 38, 47].

Betrachtet man den Rahmen und Aufbau der Versuchsreihe sollten hierbei zwei weitere Gesichtspunkte hinterfragt werden. Zum einen ist die Dauer der hyperoxygenen Exposition von 24 Stunden kritisch zu beleuchten. Es ist fraglich, ob in dieser lang andauernden Exposition bereits ein Schaden in den Mitochondrien entsteht, der irreparabel und durch keine Adaptationsmechanismen der Zellen zu verhindern ist. Zum anderen muss die Länge der

Sauerstofftherapie von 2 Stunden betrachtet werden. Hierbei ist zu hinterfragen, ob diese Sequenz eventuell zu kurz für die Adaptationsmechanismen der Zellen gegenüber der Sauerstoffradikale, gewählt wurde. Hier sind sicherlich weitere Versuche mit unterschiedlichen Zeitintervallen für die Exposition und die Sauerstofftherapie notwendig, um diese Fragen zu beantworten. Zudem ist auf die Grenzen der Methode mittels des Oxygraphen hinzuweisen, die Methode lässt lediglich eine Aussage über die Sauerstoffkonzentration und den Sauerstoffdurchfluss pro Zelle zu. Es kann also nur eine Aussage über die mitochondriale Aktivität und ihre einzelne Komplexe gemacht werden. Die Adaptationsmechanismen der Mitochondrien und der Zelle wurden hierbei nicht aufgezeigt und untersucht. Es wurden also keine Daten bezüglich der Abwehrmechanismen der Zelle gegenüber der Sauerstoffradikale erhoben. Interessant wäre hierbei unter anderem die Untersuchung der Produktion der SOD unter den hyperoxygenen Bedingungen gewesen.

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass für die Intention der Studie, nämlich die Untersuchung des Verhaltens von unterschiedlichen Zellen bezüglich ihrer mitochondrialen Aktivität unter hyperoxygenen Bedingungen die vorliegende Methode und Messungen primär ausreichend war. Weitere Versuchsreihen für die offen gebliebenen Fragen sind jedoch notwendig.

4.3. Schlussfolgerung:

Die vorliegende Studie bestätigte die bereits in vorausgegangenen Arbeiten erwiesene beeinträchtigende Wirkung von oxidativem Stress auf die mitochondriale Aktivität in Alveolarmakrophagen [6]. Diese Beeinträchtigung konnte in den aus Aszites stammenden RAW Makrophagen nicht nachgewiesen werden. Diese scheinen gegenüber Sauerstoff und seinen Radikalen resistenter zu sein. Es lässt sich hierbei die Überlegung aufstellen, dass die RAW Makrophagen eventuell bereits unter Raumluftbedingungen Adaptationsmechanismen gegenüber Sauerstoffradikale entwickeln, da Raumluft für diese Zellreihe eine hyperoxygene Umgebung darstellt. Dies würde bedeuten, dass die RAW Makrophagen im Rahmen ihrer normalen Kultivierung bereits Abwehrmechanismen gegenüber ROS entwickelt haben, und ihre mitochondriale Aktivität somit unter hyperoxygene Bedingungen weniger eingeschränkt wird als bei den Alveolarmakrophagen.

Außerdem wurde in der Studie gezeigt, dass in beiden Zellreihen keine Adaptation an die 24 – Stunden - Hyperoxie durch eine vorausgehende kurze Sauerstofftherapie von zwei Stunden erreicht werden kann. Im Gegenteil, bei den Alveolarmakrophagen scheint diese kurze Hyperoxiesequenz die mitochondriale Aktivität tendenziell sogar noch stärker zu beeinträchtigen, während sie bei den RAW Makrophagen überhaupt keinen Effekt zu verursachen scheint.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde zum einem untersucht, ob es Unterschiede in der respiratorischen Kapazität bei hyperoxygenen Bedingungen zwischen aus der Lunge stammenden (Alveolarmakrophagen, LAMs) und ubiquitär im Körper vorkommenden Zellen (RAW-Makrophagen) gibt. Zum anderen wurde untersucht, ob eine kurze Hyperoxiephase von zwei Stunden den nachfolgenden Schaden einer länger andauernden Hyperoxieexposition von 24 Stunden verringern kann. Es wurde also analysiert, ob eine kurze Hyperoxieexposition zu einer Adaptation gegenüber der schädigenden Wirkung von Sauerstoffradikalen in den Mitochondrien führt.

Zur Konkretisierung des Schadens in der Atmungskette durch die Sauerstoffradikale wurden zudem die Kapazitäten der einzelnen Komplexe unter den verschiedenen Versuchsbedingungen in beiden Zellreihen untersucht.

Um die mitochondriale Aktivität der Zellen zu beurteilen, wurde deren respiratorische Kapazität mit Hilfe der High Resolution Respirometrie durch den Oroboros Oxygraphen 2K dargestellt und analysiert. Hierbei wurde das Hauptaugenmerk auf die respiratorische Gesamtkapazität, nach maximaler Aktivierung aller Komplexe der Atmungskette, gelegt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Kruskal Wallis Testes durchgeführt.

Es ergaben sich folgende Ergebnisse: die RAW Makrophagen konnten sich einer Exposition gegenüber hyperoxygenen Bedingungen von 95% Sauerstoff und 5% CO₂ besser adaptieren als die Alveolarmakrophagen. Bei den RAW Makrophagen war keine signifikante Abnahme der mitochondrialen Aktivität unter diesen oxidativen Umgebungsbedingungen zu verzeichnen. Eine kurze Hyperoxieexposition von zwei Stunden vor der eigentlichen 24 Stunden Exposition konnte die respiratorische Aktivität beider Zellreihen nicht verbessern. Es fand keine Adaptation an den oxidativen Stress statt. Im Gegenteil, die respiratorische Kapazität schien sich durch die vorangehende Sauerstoffexposition tendenziell sogar zu verschlechtern. Die schädigende Wirkung der Sauerstoffradikale betraf vor allem den Komplex I und II, hier konnte bei den Alveolarmakrophagen eine signifikante Abnahme der respiratorischen Kapazität unter hyperoxygenen Bedingungen festgestellt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, wieder unserer Erwartungen scheinen aus der Lunge stammende Zellen nicht zwangsläufig besser mit hohen Sauerstoffkonzentrationen zurecht

zu kommen, als Zellen, die niedrigere Sauerstoffpartialdrücke gewöhnt sind. Eine kurze Gewöhnung der Zellen von zwei Stunden an hyperoxygene Bedingungen ist nicht ausreichend um den Schaden einer folgenden lang andauernden Hyperoxie von 24 Stunden zu vermindern.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Ahmad K, Schneider H G, Strong F M: Studies on the biological action of antimycin A. *Arch. Biochem*: 281-294 (1950)
- [2] Anderson C M, Nedergaard M: Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *Trends in Neuroscience*: 340-344 (2003)
- [3] Azbill R D, Mu X, Bruce-Keller a J, Mattson M P, Springer J E: Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Research*: 283–290 (1997)
- [4] Barth E, Bassi G, Maybauer D M, Simon F, Gröger M, Oter S, Speit G, Nguyuen C D, Hasel C, Möller P, Wachter U, Vogt J A, Matejovic M, Radermacher P, Calzia E: Effects of ventilation with 100% oxygen during early hyperdynamic porcine fecal peritonitis. *Critical Care Medicine*: 495–503. (2008)
- [5] Bleier L, Dröse S: Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*: 1320-1331 (2013)
- [6] Bock B: Auswirkung von normobarer Hyperoxie auf die mitochondriale Atmung von Alveolarmakrophagen. *Med Dissertation, Universität Ulm*: 1-67. (2015)
- [7] Campian J L, Qian M, Gao X, & Eaton J W: Oxygen tolerance and coupling of mitochondrial electron transport. *Journal of Biological Chemistry*: 46580–46587 (2004)
- [8] Chance B, Williams GR: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*: 477-489 (1956)
- [9] Chance B: The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. V. The energy transfer pathway. *The Journal of Biological Chemistry*: 1569–1576 (1961)
- [10] Clerch L B, Massaro D: Tolerance of Rats to Hyperoxia. *The American Society for Clinical Investigation*: 499–508 (1993)

- [11] Deakin CD, Nolan JP, Soar J, Sunde K, Koster RW, S G, P G: Erweiterte Reanimationsmaßnahmen für Erwachsene („advanced life support“). Notfall + Rettungsmedizin: 559–620 (2010)
- [12] Forman H J, Maiorino M, Ursini F: Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. Biochemistry: 997–1003 (2010)
- [13] Forman H, Kennedy J: Superoxide Production and Electron Transport in Mitochondrial Oxidation of Dihydroorotic Acid. The Journal of Biological Chemistry: 4322–4326 (1975)
- [14] Freeman B A, Crapo J D: Hyperoxia Increases Oxygen Radical Production in Rat: 10986–10992 (1981)
- [15] Gerschmann R, Gilbert DL : Effect of High Oxygen Pressure on Ground Squirrels in Hypothermia and Hibernation. Am J Physiol: 49-50 (1964)
- [16] Gnaiger E: Polarographic Oxygen Sensors, the Oxygraph, Respirometry To Assess, Drug Induced Mitochondrial Dysfunction. Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria: 327–352. (2008)
- [17] Gnaiger E: Bioenergetics at low oxygen: Dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. Respiration Physiology: 277–297. (2001)
- [18] Gnaiger E: High-Resolution Respirometry The Oxygraph for High-Resolution Respirometry (HRR). Mitochondrial Physiology Network 06.01.:1-18 (2011a)
- [19] Gnaiger E: MitoPathways: Respiratory States and Coupling Control Ratios. Mitochondrial Physiology Network 12.15: 1-11 (2011b)
- [20] Gnaiger E: Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis. Mitochondrial Physiology Network 17.18.: 1-65 (2012)
- [21] Gnaiger E, Fasching M: Oxygraph-2k Oxygraph-2k and system : specifications for respirometry and comprehensive OXPHOS analysis. Mitochondrial Physiology Network 8(04): 1–8 (2014)

- [22] Gray L R, Tompkins S C, Taylor E B: Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 2577-2604 (2014)
- [23] Groeger M, Matallo J, McCook O, Wagner F, Wachter U, Bastian O, Grierer S, Reich V, Stahl B, Huber-Lang M, Szabo C, Georgieff M, Radermacher P, Calzia E, Wagner K: Temperature and cell-type dependency of sulfide effects on mitochondrial respiration: 367-374 (2012)
- [24] Hall E D, Wang J A, Bosken J M, Singh I N : Lipid peroxidation in brain or spinal cord mitochondria after injury. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*: 1-6 (2015)
- [25] Handy D E, Loscalzo J : Redox Regulation of Mitochondrial Function. *Antioxidants & Redox Signaling*: 1323-1367 (2012)
- [26] Hirst J, King M S, Pryde K R : The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 5): 976–980 (2008)
- [27] Höffken G, Lorenz J, Kern W, Welte T, Bauer T, Dalhoff K, Dietrich E, Ewig S, Gastmeier P, Grabein B, Halle E, Koldiz M, Marre R, Sitter H :. Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobielle Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen unteren Atemwegsinfektionen sowie ambulant erworbener Pneumonie – Update 2009. S3-Leitlinie der Paul-Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie für Pneumologie und Beatmungsmedizin der deutschen Gesellschaft für Infektiologie und vom Kompetenznetzwerk. CAPNETZ: 1-68 (2009)
- [28] Hofmann F, Bläsche R, Kasper M, Barth K : A Co-Culture System with an Organotypic Lung Slice and an Immortal Alveolar Macrophage Cell Line to Quantify Silica-Induced Inflammation: 1-18 (2015)
- [29] Jamieson D, Chance B, Cadenas E: The relation of free radical production to hyperoxia. *Annual Reviews Physiology* 1986.48: 703-719 (1986)
- [30] Jamieson D, van den Brenk H: Measurement of oxygen tensions in cerebral tissues of rats exposed to high pressures of oxygen. *J.Appl. Physiol.* 869-876 (1963)
- [31] Kang S W, Lee S, Lee E K: ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth. *Archives of Pharmacal Research*: 338–345 (2015)

- [32] Keilin D, Hartree E F : Relationship between certain components of the cytochrome system. *Nature*: 200-206 (1955)
- [33] Koßobutzki C: Die Geschichte der inhalativen Sauerstofftherapie in Deutschland. Med Dissertation, Universität Lübeck (2009)
- [34] Kudin A P, Bimpong-Buta N Y B., Vielhaber S, Elger C E, Kunz W S: Characterization of Superoxide-producing Sites in Isolated Brain Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*: 4127–4135 (2004)
- [35] Kuznetsov A V, Gnaiger E : Oxygraph Assay of Cytochrome c Oxidase Activity : Chemical Background Correction: 1–4 (2010)
- [36] Löffler G, Petrides P E, Heinrich P C, *Biochemie und Pathobiochemie*. 8.Auflage Springer, Heidelberg: Seite 495 (2007)
- [37] Magnussen H, Kirsten A M, Köhler D, Morr H S: Guidelines for long-term oxygen therapy. German Society for Pneumology and Respiratory Medicine. *Pneumologie*: 748–756 (2008)
- [38] Matallo J, Vogt J, McCook O, Wachter U, Tillmans F, Groeger M, Szabo C, Georgieff M, Radermacher P, Calzia E : Sulfide-inhibition of mitochondrial respiration at very low oxygen concentrations. *Nitric Oxide*: 79–84 (2014)
- [39] McCord J. M: The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*: 652-659 (2000)
- [40] Murphy M P : How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*: 1–13 (2009)
- [41] Nagato A C, Bezerra F S, Lanzetti M, Lopes A , Silva M A S, Porto L C, Valença S S: Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. *International Journal of Experimental Pathology*: 269–278 (2012)
- [42] Niklas J, Melnyk A, Yuan Y, Heinzle E: Selective permeabilization for the high-throughput measurement of compartmented enzyme activities in mammalian cells. *Analytical Biochemistry*: 218–227 (2011)

- [43] Palleroni A V, Varesio L, Wright R B, Brunda M J: Tumoricidal alveolar macrophage and tumor infiltrating macrophage cell lines. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*: 296–302 (1991)
- [44] Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero, F M: Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radical Biology and Medicine*: 1286-1295 (2010)
- [45] Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Serena D, Ruggiero F M: Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine*: 42–50 (1999)
- [46] Pesta D und Gaigner E: High-resolution respirometry. OXPHOS protocols for human cell cultures and permeabilized fibres from small biopsies of human muscle. *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols*: 1–24 (2010)
- [47] Petrache I, Choi M E, Otterbein L E, Chin B Y, Mantell L L, Horowitz S, Choi M.: Mitogen-activated protein kinase pathway mediates hyperoxia-induced apoptosis in cultured macrophage cells. *The American Journal of Physiology*: 589–595 (1999)
- [48] Raschke W C, Baird S, Ralph P, Nakoinz I: Functional Macrophage Cell Lines Transformed by Abelson Leukemia Virus. *Cell*: 261-267 (1978)
- [49] Schlame M. and Ren M.: The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim Biophys.*: 2080-2083 (2009)
- [50] Schlame M, Rua D, Greenberg M L : The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research*: 257-288 (2000)
- [51] Slater E C: The mechanism of action of the respiratory inhibitor Antimycin A. *Biochimica et Biophysica Acta*: 129–154 (1973)
- [52] Takeshige K. and Shigeki M: NADH- and NADPH-Dependent Formation of Superoxide Anions by Bovine Heart Submitochondrial Particles and NADH-Ubiquinone Reductase Preparation. *Biochem.J.*: 129–135 (1979)
- [53] Tatarkova Z, Engler I, Calkovska A, Mokra D, Drgova A, Hodas P, Lehotsky J, Dobrota D, Kaplan P: Effect of long-term normobaric hyperoxia on oxidative stress

- in mitochondria of the guinea pig brain. *Neurochemical Research*, 36: 1475–1481 (2011)
- [54] Thorpe G W, Reodica M, Davies M J, Heeren G, Jarolim S, Pillay B, Breitenbach M, Higgings V J, Dawes I W: Superoxide radicals have a protective role during H₂O₂ stress. *Molecular Biology of the Cell*: 2876–2884 (2013)
- [55] Uversky, V N: Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: Understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell and Tissue Research*: 225-241 (2004)
- [56] Vaziri N D, Lee Y S, Lin C Y, Lin V W, Sindhu R K: NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury. *Brain Research*: 76–83 (2004)
- [57] Weisiger R A, Fridovich I: Superoxide Dismutase - Organelle Specificity. *The Journal of Biological Chemistry*: 3582–3592 (1973)
- [58] Zhao H W, Ali S S, Haddad G G : Does Hyperoxia Selection Cause Adaptive Alterations of Mitochondrial Electron Transport Chain Activity Leading to a Reduction of Superoxide Production? *Antioxidants & Redox Signaling*: 1071-1076 (2012)