

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Schmucker

**Einfluss der Inhibition der Histondeacetylase auf die
anti-entzündliche Wirkung von Steroiden**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
Aus der Medizinischen Fakultät

vorgelegt von
Maren Kunze
aus Dresden

Lübeck, Juli 2009

1. Berichtstatter: PD Dr. med. Torsten Meier

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2009

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.12.2009

Meinen Eltern Steffi und Reinhart Kunze

1. EINLEITUNG	- 9 -
1.1 Molekulare Mechanismen der Entzündung	- 10 -
1.2 Glukokortikoide	- 14 -
1.2.1 Wirkmechanismen	- 14 -
1.3 Steroidresistenz und oxidativer Stress	- 16 -
1.4 Ziele der Arbeit	- 20 -
2. MATERIAL UND METHODEN	- 21 -
2.1 Reagenzien	- 21 -
2.1.1 Puffer und Lösungen.....	- 21 -
2.1.1.1 Perfusionspuffer Ratte.....	- 21 -
2.1.1.2 Perfusionspuffer Maus	- 21 -
2.1.1.3 Elutriation	- 21 -
2.1.1.4 Histonextraktion.....	- 22 -
2.1.1.5 Gelelektrophorese	- 22 -
2.1.1.6 Western Blot	- 22 -
2.2 Modelle und Studienprotokolle	- 23 -
2.2.1 Modell der „Isoliert Perfundierten Lunge“ (IPL)	- 23 -
2.2.1.1 Präparation	- 23 -
2.2.2 Isoliert perfundierte Rattenlunge	- 24 -
2.2.2.1 Studienprotokoll.....	- 24 -
2.2.3 Isoliert perfundierte Mauslunge.....	- 25 -
2.2.3.1 Studienprotokoll.....	- 25 -
2.2.4 Humanes Monozytenmodell	- 26 -
2.2.4.1 Probanden	- 26 -
2.2.4.2 Probenentnahme und Weiterverarbeitung.....	- 27 -
2.2.4.3 Monozytenelutriation	- 27 -
2.2.4.4 Monozyten Stimulationsprotokoll.....	- 29 -
2.3 Histonextraktion	- 30 -
2.3.1 Proteinbestimmung im Histonextrakt	- 31 -
2.4 Gelelektrophorese	- 31 -
2.4.1 Prinzip der Elektrophorese.....	- 31 -
2.4.2 Probenvorbereitung.....	- 32 -

2.4.3 Vorbereitung und Durchführung	- 32 -
2.5 Western Blot	- 32 -
2.5.1 Prinzip des Western Blots.....	- 32 -
2.5.2 Vorbereitung und Durchführung	- 32 -
2.6 Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay.....	- 34 -
2.6.1 Arbeitsanleitung ELISA	- 34 -
2.7 Statistik.....	- 36 -
3. ERGEBNISSE.....	- 37 -
3.1 Isoliert perfundierte Rattenlunge.....	- 37 -
3.1.1 Beatmungsparameter	- 37 -
3.1.2 Histonacetylierung.....	- 39 -
3.1.3 Zytokinfreisetzung.....	- 39 -
3.2 Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge.....	- 42 -
3.2.1 Beatmungsparameter	- 42 -
3.2.2 Histonacetylierung.....	- 44 -
3.2.3 Zytokinfreisetzung.....	- 44 -
3.3 Humane Monozyten	- 46 -
3.3.1 Einschlusskriterien.....	- 46 -
3.3.2 Ausschluss von Probanden	- 47 -
3.3.3 Histonacetylierung.....	- 47 -
3.3.4 Zytokinfreisetzung.....	- 48 -
4. DISKUSSION	- 49 -
4.1 Methodische Diskussion.....	- 52 -
5. ZUSAMMENFASSUNG	- 55 -
7. ANHANG.....	- 64 -
7.1 Symbole, Einheiten.....	- 64 -
7.2 Elutriationsprotokoll.....	- 65 -
7.3 Harnstoffgel	- 66 -

7.4 Isolierte, Perfundierte Lunge Größe 1 Typ 893	- 67 -
7.4.1 Legende zu 7.4.....	- 68 -
7.5 Einverständniserklärung der Probanden.....	- 69 -
7.6 Erfassungsbogen Probanden	- 70 -
7.7 Laborwerte.....	- 72 -
7.7.1 Blutbild/ Differentialblutbild	- 72 -
8. DANKSAGUNG	- 73 -
9. CURRICULUM VITAE.....	- 74 -
10. PUBLIKATION.....	- 75 -

Abkürzungsverzeichnis

AAT	α 1-Antitrypsin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP-1	Activator Protein 1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ASA	American Society of Anesthesiologists
AUT	acid urea triton
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCA	Bicinchoninic acid, Bicinchoninsäure
BSA	bovine serum albumin
BSS	balanced salt solution
bzw.	beziehungsweise
C	Kontrolle, Kontrollgruppe
ca.	circa
CA	Californien
cAMP	cyclic-AMP
CBP	CREB-binding protein
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CREB	cAMP-responsive element binding
DEX	Dexamethason
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
FACS	Fluorescence Activating Cell Sorting
FDR	False discovery rate
FEV1	Forciertes Exspiratorisches Volumen, Einsekundenkapazität
FiO ₂	Fraction of inspired oxygen
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid responsive elements
HAT	Histonacetylasen
HDAC	Histondeacetylasen
HDACi	Histondeacetylaseinhibitor
HE	Histonextraktionspuffer
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid
HES	Hydroxyethylstärke
HSP	Hitzeschockproteine
Ig	Immunglobulin
I κ B	Inhibitorprotein NF- κ B
I κ K2	I κ B-Kinase 2
IL	Interleukin
IPL	Isoliert Perfundierte Lunge
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MCH	mean corpuscular hemoglobin
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	mean corpuscular volume
MEM	minimal essential medium
milliQ	Wasser aus Millipore Filteranlage
MIP2	Macrophage Inflammatory Protein 2
MPV	mean platelet volume
m-RNA	messenger-ribonucleic acid

MW	Mittelwert
n	Anzahl
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NF- κ B	Nuklear Faktor – kappa B
OV	Overventilation
PBMC	Periphere Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCAF	p300/CBP associated factors
PEEP	Positive end-expiratory pressure
P _{exp}	expiratorischer Atemwegsdruck
P _{insp}	inspiratorischer Atemwegsdruck
Pol	Polymerase
PTM	Pneumotachometer
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
SEM	Standardfehler
SLPI	Secretory Leukoprotease Inhibitor
Tab.	Tabelle
TF	Transkriptionsfaktoren
TBS	Tris buffered saline
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TRIS	Tri(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Trichostatin A
TV	Tidalvolumen
TWEEN	Synonym: Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
u.a.	unter anderem
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
U/min	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
VC	Vitalkapazität
VILI	Ventilation Induced Lung Injury
VCM	Ventilation Control Module
WHO	world health organization

1. Einleitung

Die Chronisch Obstruktive Bronchitis (COPD, engl. Chronic Obstructive Pulmonary Disease) ist ein häufiges Krankheitsbild, deren Ursache in über 90% der Fälle ein langjähriger Zigarettenkonsum ist. Sie ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der unteren Atemwege, welche mit irreversiblen Strukturveränderungen einhergeht. Nach aktuellen Schätzungen der WHO (engl. world health organization) waren 2007 bereits über 210 Millionen Menschen betroffen. Im Jahr 2005 starben drei Millionen Menschen an den Folgen der Erkrankung und bis zum Jahr 2020 wird die COPD auf Rang drei der weltweiten Todesursachen stehen [WHO Report, 2007]. Die Therapiemöglichkeiten der Erkrankung sind beschränkt. Während im Anfangsstadium die Gabe von Bronchodilatoren und Anticholinergika hilfreich ist, stehen im Fall der akuten Exazerbation lediglich die Therapie mit Antibiotika und Steroidhormonen zur Verfügung [Vogelmeier *et al.*, 2007]. Steroidhormone sind körpereigene Stoffe, die als Reaktion auf Stress (Trauma, Entzündung) ausgeschüttet werden. Sie greifen in vielfältige Stoffwechselprozesse ein, ermöglichen die Anpassung an die Stresssituation und sind in der Lage, die Bildung von Entzündungsmediatoren im Zellkern zu blockieren [Munck *et al.*, 1984; 1994]. Charakteristisch für die COPD ist, dass sie sich mit zunehmender Schwere den Therapiemaßnahmen weitgehend entzieht und häufig nur noch die symptomatische Sauerstofflangzeittherapie als therapeutische Möglichkeit verbleibt. Umso wichtiger ist es deshalb, die Ursachen des Therapieversagens zu kennen und diese, wenn möglich, gezielt zu behandeln.

Das verminderte oder fehlende Ansprechen der COPD auf Steroidhormone wird als Steroidresistenz bezeichnet. Erstmals beschrieben wurde dieses Phänomen durch Schwartz *et al.* in einem Kollektiv von Asthmapatienten [Schwartz, 1968]. Ursprünglich wurde dieses Phänomen als genetisch bedingt betrachtet [Chrousos *et al.*, 1993]. Heute geht man jedoch davon aus, dass es sich um ein erworbenes Krankheitsbild handelt. Adcock *et al.* konnten zeigen, dass es bei steroidresistenten Asthmatikern zu einer verminderten Interaktion zwischen Steroidhormonen und ihren Zielproteinen im Zellkern kommt, so dass die Steroidhormone ihre Wirkung nicht entfalten können. Dadurch wird die Produktion von Entzündungsmediatoren fortgesetzt [Adcock *et al.*, 1995; 2008b].

Hierbei stellt die Histondeacetylase 2 (HDAC2) das Schlüsselenzym dar, dessen Aktivität durch oxidativen Stress vermindert wird. Diese Form von Stress kann sowohl durch Entzündung selbst, durch Noxen, wie z.B. Zigarettenrauch, aber auch durch inhalativen Sauerstoff entstehen [Ito *et al.*, 2001; 2004; 2005].

Auch bei der Behandlung des akuten Lungenversagens (ARDS, engl. Adult Respiratory Distress Syndrome) sollten Steroidhormone ein wichtiger Therapiebaustein sein. Da es beim ARDS zu einer umfassenden Aktivierung der gesamten Entzündungskaskade kommt, werden Steroidhormone eingesetzt, um die Produktion von Entzündungsmediatoren zu reduzieren. Durch die bestehende respiratorische Insuffizienz wird häufig eine Beatmung mit hohen Sauerstoffkonzentrationen und hohen Beatmungsdrücken notwendig. Der dadurch verursachte mechanische und oxidative Stress führt hierbei zu einer zusätzlichen Entzündungsreaktion und kann somit einen beatmungsinduzierten Lungenschaden (VILI, engl. Ventilation Induced Lung Injury) auslösen [Bernard *et al.*, 1994; Held *et al.*, 2001; Uhlig, 2002]. Die Empfehlungen zur Steroidtherapie beim ARDS sind nicht eindeutig. Während eine Studie von Steinberg *et al.* [Steinberg *et al.*, 2006] keine Reduktion der Mortalität durch die Gabe von Steroidhormonen aufzeigen konnte, vertreten andere Autoren die Meinung, dass die Patienten von Methylprednisolon (1mg/kg KG/d) profitieren können [Meduri *et al.*, 2007; Pelosi *et al.*, 2008]. Die Frage, ob auch höhere Sauerstoffkonzentrationen aufgrund eines vermehrten oxidativen Stresses (Superoxid-anionen) in der Lage sind, eine Steroidresistenz zu induzieren, ist bisher nur unzureichend beantwortet.

1.1 Molekulare Mechanismen der Entzündung

Entzündliche Erkrankungen sind durch eine vermehrte Produktion spezieller Proteine, z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Enzyme, gekennzeichnet.

Zytokine sind Botenstoffe der Immunabwehr und dienen der Kommunikation zwischen immunkompetenten Zellen. In der Frühphase der Entzündung sind vor allem die Zytokine IL(Interleukin)-1, IL-6 und TNF- α (Tumor Nekrose Faktor- α) von Bedeutung. Sie stammen aus mononukleären Phagozyten (Monozyten/Makrophagen). TNF- α und IL-1 β führen zu einer Aktivierung von NF- κ B (Nuklearfaktor- κ B) und AP-1 (Activator Protein 1) [Barnes und Karin, 1997].

NF-κB ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, der in zahlreichen Zelltypen als Antwort auf eine Stresssituation (Mikroorganismen, Zytokine, oxidativer Stress) aktiviert wird. Dieses DNA-Bindungsprotein setzt sich aus den Untereinheiten p50 und p65 zusammen.

Im Ruhezustand liegt der Transkriptionsfaktor an einen Inhibitor, IκB, gebunden im Zytosol vor – der nukleäre Transport wird unterbunden. Extrazelluläre Stimuli führen über die Aktivierung von rezeptorgebundenen Kinasen zu einer Phosphorylierung von IκB und damit zur Dissoziation von NF-κB sowie zur Proteolyse des Inhibitorproteins. Das frei gewordene NF-κB gelangt mit Hilfe eines Transduktionssignals in den Zellkern, bindet an Response-Elemente der DNA und führt über die Rekrutierung zahlreicher Coaktivatoren, wie z.B. p300/CBP (CBP, CREB-binding protein; CREB, cAMP-responsive element binding protein), zur Histonacetylierung und damit Expression von pro-inflammatorischen Genen [Ogryzko *et al.*, 1996; Gerritsen *et al.*, 1997].

Die durch TNF-α und IL-1β induzierte NF-κB-Aktivität führt vor allem an den Lysinresten 8 und 12 des Histons 4 zur Acetylierung [Ito *et al.*, 2000].

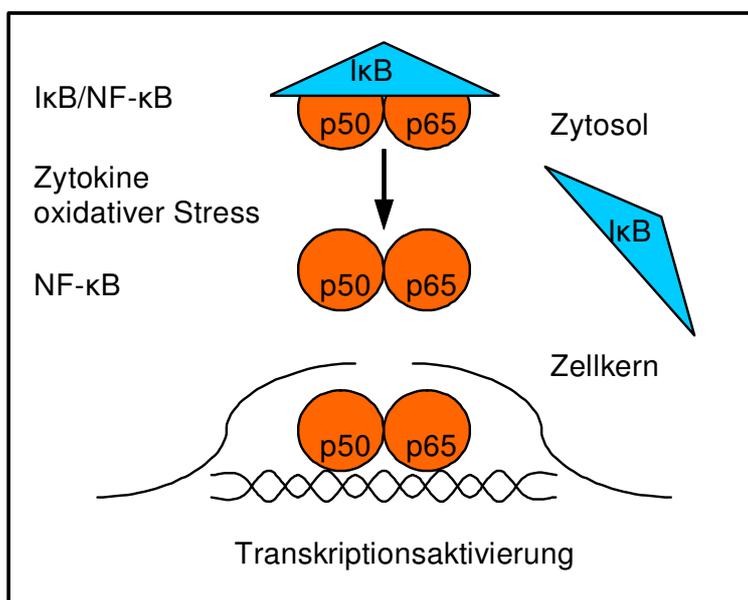


Abb. 1: Aktivierung von NF-κB

(modifiziert nach [Löffler *et al.*, 1998]) Im inaktivierten Zustand liegt NF-κB gebunden an IκB im Zytosol vor. Extrazelluläre Stimuli bewirken eine Dissoziation des Komplexes, NF-κB gelangt in den Zellkern und wird dort als transkriptionsaktivierender Faktor wirksam.

Eine vermehrte Produktion von Entzündungsmediatoren sowie deren Effekt hat eine verstärkte Genexpression zur Folge. Die genetische Information einer jeden eukaryotischen Zelle ist in Form von DNA im Zellkern gespeichert.

Jedes DNA-Molekül besteht aus zwei entgegengesetzt laufenden Nukleotidketten, welche ihrerseits aus einzelnen Basen (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin) aufgebaut sind. Infolge der Basenpaarung (Adenin–Thymin, Guanin–Cytosin), der Wasserstoffbrückenbindungen sowie der Wechselwirkungen zwischen den Basen kommt es zur Ausbildung einer Doppelhelix. Durch die Anlagerung positiv geladener Histone (Proteinmoleküle) an die DNA wird ein Nukleosom (Core Partikel) gebildet. Hierbei lagern sich je zwei Moleküle der Histone H2A, H2B, H3 und H4 zu einem Histonoktamer zusammen, um welches sich ein Teil des DNA-Stranges (146 Basenpaare) windet. Durch das Histon H1, ein so genanntes „Verbindungsprotein“ (linker-protein), werden die einzelnen Nukleosomen miteinander verbunden. Gemeinsam mit einer Vielzahl von assoziierten Proteinen (Histonen, Polymerasen, Transkriptionsfaktoren u.a.) erfolgt die Bildung des Chromatins. In einer ruhenden Zelle ist die DNA dicht um das Core-Histon gewickelt (Heterochromatin) und bietet somit keine Anlagerungsmöglichkeiten für Enzyme (RNA-Polymerase II). Die Transkription ist reprimiert [Kornberg, 1974a; Kornberg *et al.*, 1974b].

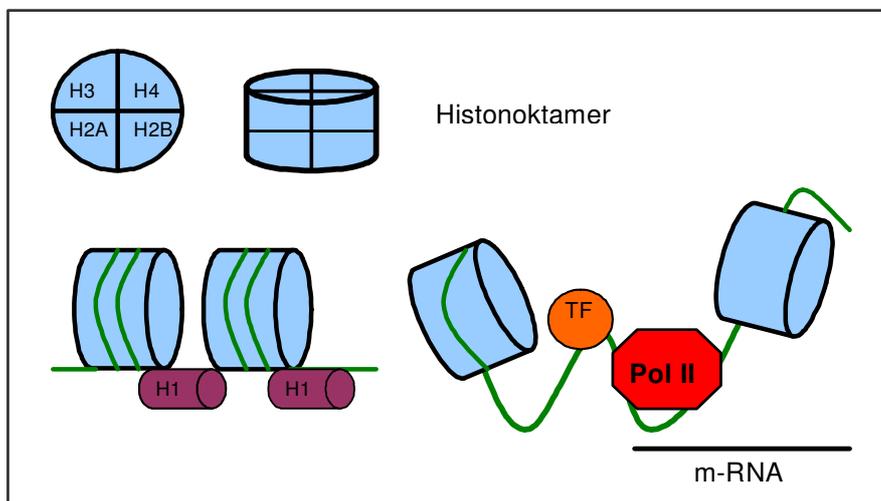


Abb. 2: Histonmodifikation

Je zwei Moleküle der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden einzelne Histonoktamere, welche durch das linker-protein H1 miteinander verbunden sind. Transkriptionsfaktoren (TF) bewirken eine Dissoziation der Histone von der DNA sowie die Anlagerung der RNA-Polymerase II (Pol II). Nur in diesem Zustand kann die Transkription erfolgen.

Für die Genexpression, Transkription und Replikation von Genen, ist die Auflockerung der Chromatinstruktur (Antirepression) notwendig.

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass die Induktion und Repression von Genen mit der Änderung der Chromatinstruktur einhergeht. Hierbei kommt es zur Anlagerung von Methyl-, Phosphoryl- oder Acetylgruppen an die Histone. Dies hat eine Änderung der Ladung und damit auch der Funktion der Histone zur Folge. Durch eine solche so genannte post-translationale Histonmodifikation wird die Chromatinstruktur gelockert und die Transkription ermöglicht [Zhang *et al.*, 2002]. Bereits 1964 wurde das Phänomen der reversiblen Histonacetylierung von Allfrey *et al.* beschrieben und wenige Jahre später die Korrelation von Histonacetylierung und Genexpression publiziert [Allfrey *et al.*, 1964; Allfrey, 1970; Wangh, 1972; Allfrey, 1977].

Das Histon 4 kann an vier verschiedenen Lysinresten acetyliert werden: K5, K8, K12, K16 [Zhang *et al.*, 2002]. Wie bereits dargestellt, erfolgt bei der entzündungsbedingten, NF- κ B vermittelten Gentranskription, die Acetylierung an den Lysinresten K8 und K12 [Wangh, 1972; Ito *et al.*, 2000; Roth *et al.*, 2001]. Die Anlagerung von Acetylgruppen erfolgt mit Hilfe von Histonacetyltransferasen (HAT). Dies führt zur Neutralisierung der positiv geladenen Histone und damit zur Dissoziation der negativ geladenen DNA. Die HAT agiert nicht allein, sondern ist oftmals Bestandteil eines Proteinkomplexes, der in seiner Gesamtheit als Transkriptionsfaktor/Coaktivator wirksam wird [Ogryzko *et al.*, 1996; Gerritsen *et al.*, 1997]. Die vermehrte Histonacetylierung ermöglicht die Anlagerung der RNA-Polymerase II, die die entsprechenden Genabschnitte transkribiert. Das unmittelbare Produkt, die mRNA, wird zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert, wo die Übersetzung der Basensequenz in ein Protein erfolgt.

Die Histondeacetylasen (HDAC) führen zur Abspaltung der Acetylgruppen und beenden dadurch den Transkriptionsvorgang. Neben der Suppression von inflammatorischen Genen haben HDACs wichtige Funktionen bei der Reparatur der DNA und der Zellproliferation [Bhavsar *et al.*, 2008]. Bisher sind 11 verschiedene HDACs bekannt [de Ruijter *et al.*, 2003]. Vor allem die HDAC1 und 2 spielen bei der Reduktion NF- κ B induzierter Histonacetylierung eine wesentliche Rolle. So inhibieren sie unter anderem den Transkriptionsfaktor NF- κ B, induzieren dessen Assoziation mit I κ B sowie seine Rückkehr ins Zytoplasma [Chen *et al.*, 2001].

Acetylierung und Deacetylierung befinden sich in einem dynamischen Prozess, welcher bei der Transkription zugunsten der Hyperacetylierung und in Ruhe in Richtung Hypoacetylierung verschoben ist. Die Histonacetylierung ist demnach ein Indikator für die Transkriptionsaktivität der Zelle.

1.2 Glukokortikoide

Die anti-entzündliche Wirkung von Glukokortikoiden wurde erstmals von Hench im Jahre 1949 beschrieben [Hench, 1949]. Hench stellte fest, dass die Symptome der Rheumatoiden Arthritis vor allem während der Schwangerschaft abnahmen. Er schlussfolgerte, dass dies auf eine Erhöhung der physiologischen Glukokortikoidkonzentration zurückzuführen ist und konnte nachweisen, dass die Gabe von niedrigen Kortisondosen einen positiven Effekt auf die Symptome der Erkrankung hat. Seit dieser Zeit besitzen Glukokortikoide bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen eine zentrale Bedeutung.

Glukokortikoide werden in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet und nach einer eigenen zirkadianen Rhythmik sowie infolge von Stress (Trauma, Entzündung) freigesetzt. Koordiniert wird die Freisetzung durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse [Munck *et al.*, 1984].

1.2.1 Wirkmechanismen

Die Wirkung von Glukokortikoiden beruht auf vielfältigen Mechanismen. Allen gemein ist, dass Steroidhormone an einen intrazellulären, zytoplasmatischen Glukokortikoidrezeptor (GR) binden und nach Einschleusen in den Zellkern Einfluss auf die Genexpression nehmen. Die Informationen für den GR sind auf einem einzigen Gen codiert. Infolge von alternativem Spleißen existieren zwei Formen von Glukokortikoidrezeptoren: GR α und GR β [Lu *et al.*, 2004]. Im Gegensatz zum GR α , wird GR β nicht von Glukokortikoiden aktiviert und ist nicht in der Lage, an die DNA zu binden [Pujols *et al.*, 2002]. Im inaktiven Zustand befindet sich der Steroidrezeptor an einen Komplex von Hitzeschockproteinen (HSP 90, HSP 56) gebunden im Zellplasma. Die Anlagerung des Liganden bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors. Infolge der Dissoziation der Hitzeschockproteine wird die Translokation in den Zellkern ermöglicht [Beato *et al.*, 1996].

Glukokortikoide entfalten ihre Wirkung über verschiedene Mechanismen:

1. Der GR-Komplex bindet direkt oder indirekt an die aktivierten Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B sowie an Coaktivatoren und inhibiert ihre intrinsische Histonacetylaseaktivität. Die Transkription pro-inflammatorischer Gene wird unterbunden [Barnes und Karin, 1997].
2. Nach der Bildung eines GR-Komplex-Dimers erfolgt die Bindung an Glucocorticoid-responsive-elements (GREs). Dies sind spezifische DNA-Sequenzen in der Promotorregion zahlreicher pro-inflammatorischer Gene. Über die Transkriptionseinhibition nachfolgender Genabschnitte kommt es zur Verminderung der Expression (Zytokine, Enzyme, Adhäsionsmoleküle).
3. Die GREs besitzen nicht nur einen inhibierenden, sondern auch einen stimulierenden Effekt auf nachfolgende Gensequenzen. Dies trifft auf Gene zu, deren Produkte anti-inflammatorisch wirksam sind (IL-10, Lipocortin 1, SLPI, Secretory Leukoprotease Inhibitor) oder aber die Signalkaskade der Entzündungsreaktion unterbrechen [Ito *et al.*, 2000]. So kommt es zum Beispiel unter Einwirkung von Glukokortikoiden zur Steigerung der I κ -B α -Produktion und damit zu verminderten Wirksamkeit von NF- κ B [Auphan *et al.*, 1995].
4. Infolge der Glukokortikoidwirkung kann es zur gesteigerten Bildung von Ribonukleasen kommen, die die gebildete m-RNA destabilisieren und dadurch u.a. zu einer verminderten Zytokinproduktion führen [Shim *et al.*, 2002].

Für die anti-inflammatorische Wirkung der Steroidhormone stellt die nukleäre HDAC2 ein Schlüsselenzym dar. Der aktivierte GR-Komplex ist in der Lage, die HDAC2 zu rekrutieren. Durch die Reduktion der Histonacetylierung wird die Expression der pro-inflammatorischen Gene gemindert. Dies trifft vor allem für die NF- κ B bedingte Histonacetylierung zu. So wurde beschrieben, dass die Gabe von Dexamethason die IL-1 β induzierte Acetylierung von H4K8 und H4K12 (Histon 4, Lysinrest 8/12) hemmt. Dies geschieht über die direkte Inhibition des Coaktivator-komplexes (CBP) sowie durch die Rekrutierung der HDAC2 zum Coaktivator-komplex (p65-CBP-HAT) [Ito *et al.*, 2000; Ashburner *et al.*, 2001].

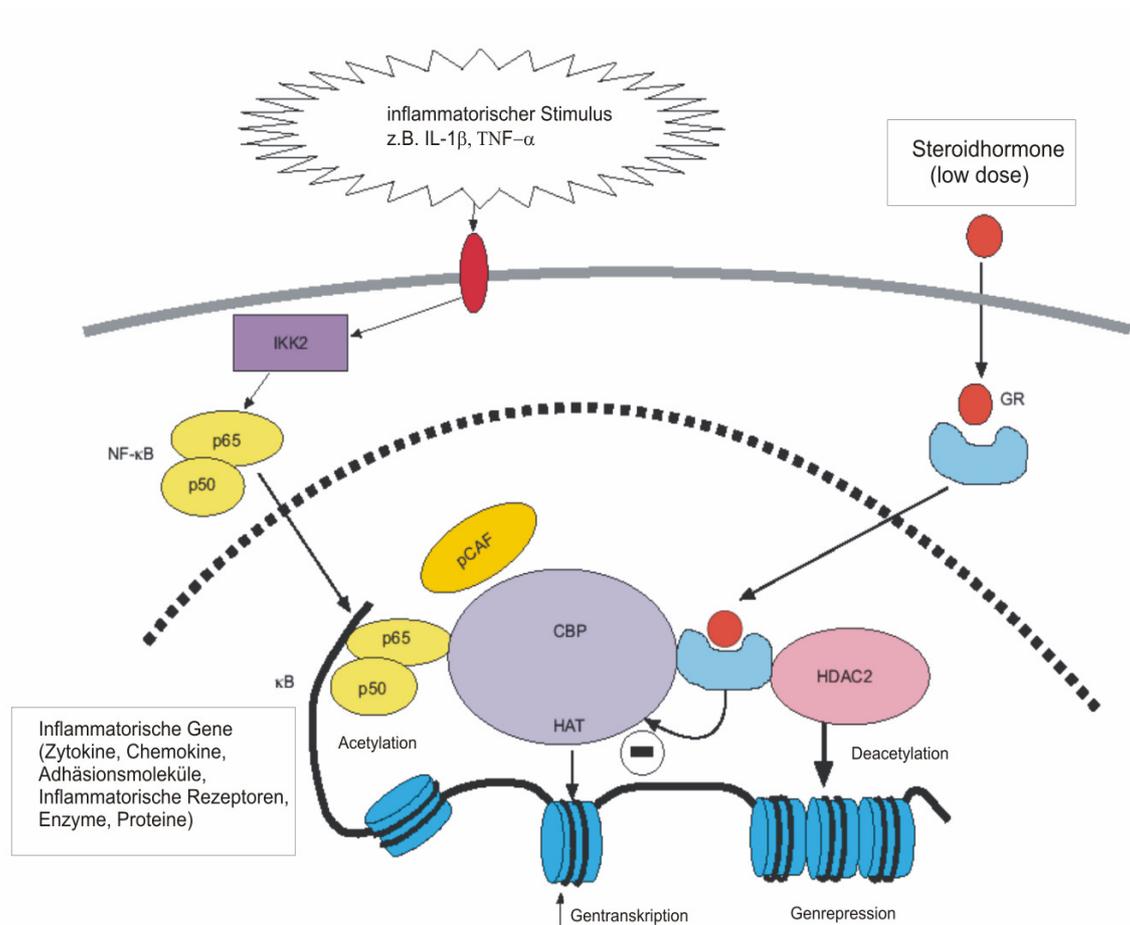


Abb. 3: Wirkmechanismus der Steroidhormone [Barnes, 2006a]

Inflammatorische Stimuli ($IL-1\beta$, $TNF-\alpha$) führen über $I\kappa B$ -Kinase2 (IKK2) zur Aktivierung von NF- κB (p50/p65). CBP und p300/CBP assoziierte Faktoren (pCAF) sowie NF- κB selbst bewirken über HAT die Transkription inflammatorischer Gene. Über die Bindung an einen GR-Rezeptor gelangen Steroidhormone in den Zellkern und inhibieren die HAT direkt und indirekt, bzw. führen über die Rekrutierung der HDAC2 zur Suppression der Transkription. \uparrow : Erhöhung; -: Suppression.

1.3 Steroidresistenz und oxidativer Stress

Wie oben beschrieben, stellt das Nichtansprechen auf Steroidhormone ein wesentliches Problem in der Therapie der COPD dar. Als Schlüsselmechanismus dieser Steroidresistenz wird die Inaktivierung der HDAC2 durch oxidativen Stress angesehen.

Unter oxidativem Stress versteht man den Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl. reactive oxygen species) und/oder das Fehlen von antioxidativen Kapazitäten.

Endogene Quellen des ROS sind Mitochondrien, Peroxisomen, die NADPH-Oxidase oder Cytochrom P450. Das bedeutet, dass selbst bei regulären Stoffwechselprozessen ROS entstehen, welche durch körpereigene anti-oxidative Mechanismen unschädlich gemacht werden. Dies geschieht durch die Enzyme Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Katalase [Repine *et al.*, 1997].

Aber auch Zigarettenrauch, Sauerstoff sowie inflammatorische Zytokine führen zur Entstehung von Superoxidradikalen, die die körpereigenen Schutzmechanismen überfordern [Church *et al.*, 1985]. Die entstandenen ROS aktivieren die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 und induzieren eine Entzündungsreaktion [Rahman, 2002; Stuber *et al.*, 2002]. Des Weiteren können Steroidhormone aufgrund einer verminderten HDAC2-Aktivität ihre anti-inflammatorische Wirkung nicht entfalten, es kommt zur Steroidresistenz.

Der Einfluss von hochkonzentriertem Sauerstoff auf das Lungengewebe wurde sowohl in experimentellen, wie auch klinischen Studien untersucht. In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass ein FiO₂ von 50% für 44h zu einer verstärkten Lipidperoxidation, einem Anstieg der Konzentrationen an α 1-Antitrypsin (AAT), Leukotrien B₄ (LTB₄) durch Alveolarmakrophagen sowie einer Zunahme von Neutrophilen in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) führt. Hierbei dienten die Peroxidation von Lipiden sowie die AAT-Konzentration als Marker für oxidativen Stress [Griffith *et al.*, 1992]. Die Kombination von mechanischem Beatmungsstress mit hohen Sauerstoffkonzentrationen wurde bislang noch nicht untersucht und soll ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit sein.

Für die Erklärung der Steroidresistenz existieren drei verschiedene pathophysiologische Erklärungsansätze:

1. Inaktivierung der HDAC2

Steroidhormone sind in der Lage, die HDAC2 zu aktivieren und dadurch die Transkription von pro-entzündlichen Zytokinen zu hemmen. Sowohl bei Rauchern als auch bei COPD-Patienten konnte eine verminderte Aktivität und Expression der HDAC2 gezeigt werden.

Die herabgesetzte Enzymaktivität bedingt die Dominanz der Histonacetylasen und damit die verstärkte Expression pro-inflammatorischer Faktoren (v.a. TNF- α , IL-8). Ursächlich für die reduzierte HDAC2-Aktivität bei COPD-Patienten ist oxidativer Stress [Ito *et al.*, 2001; Barnes, 2006b; Adcock und Barnes, 2008a]. Über die Interaktion von Superoxidanionen und Stickstoffmonoxid kommt es zur Bildung von Peroxynitriten, welche in der Lage sind, Tyrosinreste im aktiven Zentrum der HDAC2 zu nitrieren. Dieser Mechanismus konnte bereits an epithelialen Zellen *in vivo* nachgewiesen werden [Ito *et al.*, 2004]. Die Nitrierung von Proteinen führt nicht nur zum Verlust ihrer enzymatischen Aktivität, sondern erhöht auch deren Anfälligkeit für Proteasomen [Buchczyk *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2003]. Die Folge ist ein vermehrter enzymatischer Abbau. Da die HDAC2 eine wesentliche Rolle bei der Wirkung von Glukokortikoiden spielt, lässt sich das fehlende Ansprechen auf die Steroidtherapie durch eine verminderte Enzymaktivität erklären. Neben den bereits genannten Ursachen der verminderten HDAC2-Aktivität, gibt es noch weitere Möglichkeiten die Funktion des Enzyms zu beeinflussen. Hierbei wird die Gabe von Trichostatin A (TSA) pharmakologisch genutzt.

TSA ist ein Zellgift, welches den Zellarrest induziert. Es wurde im Jahr 1976 erstmals als Antimykotikum beschrieben [Tsuji *et al.*, 1976]. Einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass TSA über die Inaktivierung von HDACs zur Hyperacetylierung der Histone führt [Yoshida *et al.*, 1987]. TSA entfaltet seine Wirkung, indem es am aktiven Zentrum der HDAC bindet und die Interaktion von Enzym und Substrat hemmt [Finnin *et al.*, 1999]. Mit Beginn der 90er Jahre wurde es in einer Vielzahl von Studien als HDAC-Inhibitor (HDACi) eingesetzt [Iwata *et al.*, 2002]. In Anlehnung an die Hypothese, dass TSA die Acetylierung von Histonen in der Gegenwart pro-inflammatorischer Gene erhöht, konnte in Zellkulturen gezeigt werden, dass TSA über eine gesteigerte IL-8 Produktion pro-inflammatorisch wirkt [Iwata *et al.*, 2002; Gilmour *et al.*, 2003; Keslacy *et al.*, 2007]. Andererseits ist TSA *in vivo* in der Lage, die Expression von IL-4, IL-5 und Immunglobulin E zu reduzieren, es kann demnach auch anti-inflammatorisch wirksam werden [Choi *et al.*, 2005]. So konnte im Sepsis- und Arthritismodell gezeigt werden, dass TSA die LPS-induzierten Entzündungsmediatoren hemmt [Leoni *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2007].

Daher wird es derzeit als Therapieoption bei pulmonalen Erkrankungen wie Bronchialkarzinomen, COPD und Asthma diskutiert [Adcock *et al.*, 2005; Adcock, 2006; Schrump *et al.*, 2006; Bhavsar *et al.*, 2008].

2. Inaktivierung des Glukokortikoidrezeptors α (GR α)

Im Sputum von COPD-Patienten konnte ein erhöhtes Vorkommen an NF- κ B festgestellt werden [Wright *et al.*, 2003]. Durch Komplexbildung mit aktiviertem GR α wird die Aktivität und Affinität der GR α -Moleküle reduziert und der Steroidhormoneffekt abgeschwächt [Almawi *et al.*, 1991; Kam *et al.*, 1993; Spahn *et al.*, 1996].

3. Relative periphere Steroidresistenz

Neben intranukleären Prozessen spielen beim Auftreten der Steroidresistenz auch zelluläre und extrazelluläre Vorgänge eine Rolle. Die vermehrte körpereigene Steroidproduktion infolge von Trauma und Entzündung verursacht einen Anstieg der Kortisolkonzentration im Blut. Geschieht dies über einen längeren Zeitraum, kommt es zu einer Abnahme der Rezeptordichte. Unmittelbare Folge dieser Abnahme ist eine periphere Steroidresistenz [Meduri, 1999; Meduri *et al.*, 2002].

In dieser Arbeit wurde nur der erstgenannte Mechanismus untersucht.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von Steroidhormonen, inflammatorischer Stimulierung und oxidativem Stress auf den Grad der Histonacetylierung und Zytokinfreisetzung im Isoliert Perfundierten Lungenmodell (IPL) und humanen Monozytenmodell zu untersuchen. Insbesondere die Frage, ob Sauerstoff zur Steroidresistenz führen kann, stand im Mittelpunkt.

Folgende Hypothesen wurden untersucht:

1. Pro-inflammatorische Stimuli (IL-1 β , LPS, alveoläre Überdehnung) führen zu einer vermehrten Histonacetylierung.
2. Der anti-inflammatorische Effekt von Dexamethason ist abhängig von der Aktivität der HDAC2.
3. Oxidativer Stress hebt durch die Inhibition der HDAC2 den Steroidhormoneffekt auf.

Die Überprüfung der Hypothesen wurde mit Hilfe zweier Tierversuche im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Lungen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurden Rattenlungen ventiliert und mit Lipopolysacchariden (LPS), Dexamethason (DEX) sowie TSA perfundiert. TSA diente hierbei als Inhibitor der Histondeacetylasen. In der zweiten Versuchsreihe wurden Mäuselungen zum einen physiologisch und zum anderen mit erhöhten Tidalvolumina ventiliert. In diesem Modell wurde der Einfluss von Dexamethason sowie die Applikation von reinem Sauerstoff (FiO₂ 1,0, oxidativer Stress) untersucht. Um die gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen zu übertragen, wurden diese in einer dritten Versuchsreihe mit einem humanen Monozytenmodell kontrolliert.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien

2.1.1 Puffer und Lösungen

In der vorliegenden Arbeit wurden vorrangig Reagenzien der Firmen Braun, Fluka, Merck, Roth, Roche und Sigma-Aldrich (Deutschland) verwendet. Bei der Nutzung von Produkten anderer Firmen, sind diese im Text separat aufgeführt. Für die Herstellung von Pufferlösungen wurde Wasser aus einer Millipore Filteranlage (Milli-Q acadèmic, 0,2µm Rundfilter) genutzt (kurz: H₂O milliQ).

2.1.1.1 Perfusionspuffer Ratte

Krebs-Henseleit-Puffer (570mOsm)

118mM Natriumchlorid, 4,7mM Kaliumchlorid, 1,2mM Kaliumhydrogenphosphat, 1,2mM Magnesiumsulfat, 24,9mM Natriumhydrogencarbonat ad 2l H₂O milliQ.

Perfusionspuffer

je 200ml: 4% Albumin, 5,5mM Glukose, 12,5mM HEPES, 95ml Krebs-Henseleit-Puffer (570mOsm), 2,5mM Calciumchlorid ad 200ml H₂O milliQ. Es folgte das Sterilfiltrieren des Puffers sowie das Einstellen des pH auf 7,0.

2.1.1.2 Perfusionspuffer Maus

HES-Medium (Serag Wiessner, Deutschland), 2% MEM Aminosäurelösung (50x), 1% MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100%), 1% MEM Vitamine (100%), 1% Ultra-Glutamine (Cambrex, Belgien), 0,12% Natriumchlorid (Serva, Deutschland)
Der pH des Perfusionspuffers wurde auf 7,0 eingestellt.

2.1.1.3 Elutriation

Phosphatgepufferte Salzlösung – PBS

137mM Natriumchlorid, 2,6mM Kaliumchlorid, 8,1mM Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, 2,0mM Kaliumhydrogenphosphat ad 1l Aqua dest.

Im Anschluss erfolgten das Sterilfiltrieren der Pufferlösung sowie das Einstellen des pH auf 7,2 – 7,4.

Hanks` Puffer

Hanks` Balanced Salt Solution (BSS) Pulver + Phenolrot, 4,5mM Natriumhydrogencarbonat, 10mM HEPES, Penicillin/ Streptomycin, ad 1l Aqua dest.. Der Puffer wurde weiterhin mit 0,1% BSA versetzt und sterilfiltriert.

2.1.1.4 Histonextraktion

Lysepuffer – Histonextraktionspuffer 1 (HE1)

10mM Tris/HCl (pH 6,5), 50mM Natriumdisulfit, 10mM Magnesiumchlorid, 8,6% Sucrose, 0,5% NP40, 10mM Natriumbutyrat, 1 Tablette Complete Mini, 100mM Natriumbutyrat ad 10ml H₂O milliQ wurde sterilfiltriert und bei +4 °C aufbewahrt.

Waschpuffer – Histonextraktionspuffer 2 (HE2)

10mM Tris/HCL (pH 7,4), 13mM EDTA ad 50ml H₂O milliQ.

Histonextraktionspuffer 3 (HE3)

50mM Tris/HCL (pH 7,9), 10mM Natriumchlorid, 0,25mM EDTA, 10mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerol ad 100ml H₂O milliQ.

2.1.1.5 Gelelektrophorese

AUT-Probenpuffer 2x

8M Harnstoff, 0,7mM 2-Mercaptoethanol, 20% Glycerol, 6% Eisessig, 0,1% Pyronin Y ad 10ml H₂O milliQ.

AUT-Laufpuffer (Transferpuffer)

100mM Glycine, 0,6% Eisessig ad 5l H₂O milliQ.

2.1.1.6 Western Blot

Blotpuffer

25mM Tris/HCL (pH 8,3), 192mM Glycine, 0,1% SDS ad 1l H₂O milliQ.

TBS 10x (Stocklösung)

1,3M Natriumchlorid, 200mM TRIS ad 1l H₂O milliQ.

Der pH der Stocklösung wurde mit Hilfe von 32% HCL auf 7,6 eingestellt.

TBS

0,1% TBS 10x ad. 1l H₂O milliQ. Die Lösung wurde sterilfiltriert.

TBS-T

1x TBS, 0,1% Tween 20 (Polyoxyethylen (20)sorbitan-monolaurat).

2.2 Modelle und Studienprotokolle

2.2.1 Modell der „Isoliert Perfundierten Lunge“ (IPL)

Für die Überprüfung unserer Hypothesen verwendeten wir das Modell der „Isoliert Perfundierten Lunge“ (IPL) der Firma Hugo Sachs Elektronik, Deutschland (7.4). Die Planung und Betreuung der Tierversuche erfolgte durch Prof. Dr. Stefan Uhlig und Dr. Heike Dombrowsky, Forschungszentrum Borstel. Sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimente wurden angezeigt (§ 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 Tierschutzgesetz, Schleswig-Holstein). Die Tiere wurden unter Standardbedingungen im Tierstall des Forschungszentrums gehalten.

2.2.1.1 Präparation

Das Modell der Isoliert perfundierten und ventilerten Mäuselunge wurde wie von A. von Bethmann publiziert durchgeführt [von Bethmann *et al.*, 1998]. Im nachfolgenden Abschnitt wird die Präparation der Lunge am Beispiel der Maus beschrieben.

Zu Beginn erfolgte eine Anästhesie mit 400µl Narcoren® (1:15 in PBS). Nach Verlust der Schutzreflexe wurde die Maus rücklings auf die Korkplatte der Beatmungskammer gelegt und das Bauchfell mit 70% Ethanol desinfiziert.

Mit Hilfe des Skalpell erfolgte ein vertikaler Schnitt vom Kehlkopf bis zum Bauch. Nach Präparation und Ligatur der Luftröhre wurde eine Trachealkanüle eingeführt und fixiert. Um die nachfolgende Präparation zu erleichtern, wurde die Lunge mit Überdruck beatmet (Frequenz: 90/min, Tidalvolumen 250-300µl).

Nach der Eröffnung des Bauchraums und dem Abtrennen des Zwerchfells, wurden 100µl Heparin (12,5mg/ml in PBS) in das Herz injiziert. Mit Durchtrennung der unteren Hohlvene wurde das Gefäßsystem entleert. Mittels Sternotomie wurde der Brustraum eröffnet und sowohl die Pulmonalarterie, als auch die Aorta mit einer Ligatur versehen. Durch den rechten Ventrikel wurde eine Perfusionskanüle eingeführt, in die Pulmonalarterie vorgeschoben und fixiert. Eine weitere Kanüle wurde über den linken Ventrikel in den linken Vorhof eingebracht und ebenfalls fixiert. Über die Kanülierung der Pulmonalarterie bzw. des linken Ventrikels wurde eine Perfusion der Lunge erreicht. Nach vollständiger Präparation wurde die Kammer geschlossen und die Lunge mit Unterdruck beatmet.

2.2.2 Isoliert perfundierte Rattenlunge

Im Mittelpunkt der ersten Versuchsreihe stand das Modell der Isoliert perfundierten Rattenlunge. Bei den Versuchstieren handelte es sich um weibliche Wistar Ratten (200-250g) der Firma Charles River, Deutschland. Als Apparatur diente die IPL (IL-2) Typ 123, Hugo Sachs Elektronik, Deutschland. Nach Präparation der Lunge erfolgte die Perfusion (Perfusionspuffer 2.1.1.1) mit einem Fluss von 30ml/min. Über den gesamten Zeitraum des Experiments (240min) wurde die Lunge mit einem end-inspiratorischen Druck (P_{insp}) von $-7\text{cmH}_2\text{O}$ und einem end-expiratorischen Druck (P_{exp}) von $-3\text{cmH}_2\text{O}$ ventiliert. Die Beatmungsfrequenz betrug 80/min, das Verhältnis von Inspiration zu Expiration 1:1.

2.2.2.1 Studienprotokoll

Zu Beginn wurden die 24 Versuchstiere in sechs Gruppen unterteilt:

1. Kontrollgruppe (control, C; n=3)
2. Kontrolle plus Perfusion mit TSA (C/TSA; n=3)
3. Kontinuierliche Perfusion mit LPS (LPS; n=3)
4. Wie Gruppe 3 plus Perfusion mit TSA (LPS/TSA; n=3)
5. Kontinuierliche Perfusion wie Gruppe 3 plus Dexamethason 10^{-6} M und 10^{-8} M, Daten wurden gepoolt, (LPS/DEX; n=6)
6. Wie Gruppe 5 plus Zugabe von TSA (LPS/DEX/TSA; n=6)

Die Zugabe von TSA (100ng/ml) und Dexamethason erfolgte 30min nach Versuchsbeginn. Die kontinuierliche Perfusion mit LPS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) begann nach 40min. Zum Zeitpunkt 0, sowie nach 30 und 40min erfolgte die Entnahme von Perfusatproben. Im Anschluss wurden alle 30min Proben entnommen.

Am Ende des Versuchs wurden die einzelnen Lungenflügel in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Perfusatproben wurden direkt nach der Abnahme eingefroren. Zur Vorbereitung der Histonextraktion wurden die Rattenlungen in flüssigem Stickstoff zu Pulver verarbeitet und mit kalten PBS gewaschen. Die Durchführung dieser Versuche erfolgte durch Frank Seel und Anke Kowallik, Forschungszentrum Borstel.

2.2.3 Isoliert perfundierte Mauslunge

Für den nachfolgenden Versuch wurden weibliche Balb/C Mäuse (20-25g) der FU Berlin verwendet. Als Apparatur diente hierbei die IPL Größe 1 (IL-1), Typ 839, Hugo Sachs Elektronik, Deutschland (7.4).

Die Präparation und Perfusion (1ml/min) der Lunge erfolgte wie unter 2.2.1.1 beschrieben. Als Perfusionsmedium diente HES-haltiges RPMI 1640 (2.1.1.2). Innerhalb der ersten 60 Minuten wurden die Lungen druckkontrolliert beatmet ($P_{\text{insp}} -10\text{cmH}_2\text{O}$, $P_{\text{exp}} -3\text{cmH}_2\text{O}$). Die Beatmung erfolgte mit einer Frequenz von 93/min sowie einem Inspirations-/Expirationsverhältnis von 1:1.

2.2.3.1 Studienprotokoll

Die 37 Versuchstiere wurden zu Beginn in vier Gruppen unterteilt. Nach einer 60-minütigen Beatmung mit den oben genannten Parametern erfolgte die Modifikation der Versuchsbedingungen:

1. Kontrollgruppe, $P_{\text{insp}} -10\text{cmH}_2\text{O}$, $P_{\text{exp}} -3\text{cmH}_2\text{O}$ (control, C; n=8)
2. Überdruckbeatmung, $P_{\text{insp}} -22,5\text{cmH}_2\text{O}$ (Overventilation, OV; n=8)
3. Überdruckbeatmung wie in Gruppe 2 sowie kontinuierliche Perfusion mit Dexamethason 10^{-6}M und 10^{-8}M , Daten wurden gepoolt, (OV/DEX; n=11)
4. Überdruckbeatmung sowie Perfusion wie in Gruppe 3, Anreicherung der Beatmungsluft mit 100% medizinischem Sauerstoff (OV/DEX/ O_2 ; n=10)

Die Beatmung unter den oben aufgeführten Bedingungen wurde über einen Zeitraum von 180min aufrechterhalten (Beatmungsdauer insgesamt 240min). Im Abstand von 30min wurden Perfusatproben für die Bestimmung der Zytokin-konzentrationen entnommen und umgehend eingefroren.

Am Ende des Experiments wurde die gesamte Lunge in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Für die Vorbereitung der Histonextraktion wurden die Lungen mit Hilfe eines Mörsers in flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit kaltem PBS gewaschen. In die Auswertung eingeschlossen wurden alle Versuche, bei denen über den gesamten Zeitraum von 240min eine problemlose Beatmung und Perfusion möglich war.

Die Durchführung dieser Versuche erfolgte von Dörte Karp, Forschungszentrum Borstel.

2.2.4 Humanes Monozytenmodell

2.2.4.1 Probanden

Untersuchungsgut der Studie waren humane Monozyten, die aus 250ml venösem Blut der Probanden elutriert wurden (Ethikantrag 04-053, Universität zu Lübeck). Neben Aufklärung und Einwilligung (7.5) der Probanden mussten folgende Einschlusskriterien erfüllt sein: Alter zwischen 18-65 Jahren, Nichtraucher, subjektives Wohlbefinden und Einstufung in die Gruppe 1 der ASA Klassifikation (ASA; engl.: American Society of Anesthesiologists, Einschätzung des Anästhesierisikos) [Roissant *et al.*, 2008]. Ausschlusskriterien waren neben Allergieneigung und Autoimmunerkrankungen, aktuelle Entzündungszeichen sowie Infektionen und Impfungen in den vergangenen sechs Wochen.

Die Auswahl der Probanden erfolgte unter Berücksichtigung der Einschlusskriterien einerseits im Bereich der Studierenden und Mitarbeiter der Universität zu Lübeck, andererseits wurde die Blutspenderkartei von Frau Bergmann, Forschungszentrum Borstel, genutzt. In dieser Kartei sind Angestellte des Forschungszentrums registriert, die in regelmäßigen Abständen für Studienzwecke Blut spenden. In der Auswahl der Probanden wurde neben der Einhaltung der Regenerationszeit zwischen zwei Blutspenden (mindestens acht Wochen) und der Einschlusskriterien auch die bisher elutrierte Menge an Monozyten berücksichtigt.

Um die Einschlusskriterien der Studie zu überprüfen, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Anamnese (Grunderkrankungen, Medikation, Infekte, Impfungen)
- Auskultation von Herz und Lunge
- Blutdruckmessung (nach Riva Rocci)
- manuelle Pulskontrolle
- Lungenfunktion, Kurzspirometrie, Blutgasanalyse kapillär
- Differentialblutbild

Die Lungenfunktionsprüfung sowie die Blutgasanalyse wurden vom Pneumologischen Funktionslabor der Medizinischen Klinik III des UKSH, Campus Lübeck oder dem Funktionslabor der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel durchgeführt.

Das Differentialblutbild wurde durch das Zentrallabor des UKSH Campus Lübeck bzw. durch das Klinische Chemie Labor der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel ermittelt.

2.2.4.2 Probenentnahme und Weiterverarbeitung

Nach Prüfung der Einschlusskriterien und der positiven Bewertung der Untersuchungsergebnisse wurden 250ml venöses Blut entnommen (Blutentnahmesystem Donafix VPK 1,5, Braun, Deutschland). Aufgefangen und aufbewahrt wurde das Blut in einer sterilen Glasflasche, welche mit 62,5ml Trinatriumcitratdihydrat (3,8%, 3,8g ad 1l Aqua dest., Firma Merck) zur Antikoagulation versetzt war. Des Weiteren erfolgte die Blutentnahme für ein Differentialblutbild. Die Weiterverarbeitung und Aufbereitung des Blutes wurde im Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, durchgeführt. Begleitet wurde die Studie durch Frau Renate Bergmann, Biologielaborantin. Das Probenmaterial wurde in einer Styroporbox mittels PKW (ca. 45km) transportiert.

Im zweiten Abschnitt der Studie stammten die Probanden vorrangig aus Borstel. Die erforderlichen Untersuchungen sowie die Probenentnahme fanden in gleicher Art und Weise statt. Um die Homogenität der Methode aufrecht zu erhalten, wurde der Transport des Blutes nachempfunden, indem wir das Blut ebenfalls in einer Styroporbox ca. 45min auf einen Rüttler (IKA Schüttler MTS 2, Janke&Kunkel, IKA Labortechnik) stellten.

2.2.4.3 Monozytenelutriation

Im Mittelpunkt der Studie standen humane Monozyten. Um diese aus dem Vollblut zu isolieren, wurde das Blut zunächst in seine Bestandteile aufgetrennt. Primäres Ziel war es, die mononukleären Zellen des peripheren Blutes zu isolieren [Boyum, 1968]. Diese so genannten PBMCs (engl. periphäre blood mononuclear cells), bestehend aus Lymphozyten und Monozyten, konnten ihrerseits wiederum mittels Elutriation nach Größe aufgetrennt werden [Grage-Griebenow *et al.*, 1993].

Die Elutriation von Zellen beruht auf dem Gegenstromprinzip. Die isolierten PBMCs werden bei 31 Umdrehungen pro Minute (U/min) in den Elutriator eingeladen und ordnen sich gemäß ihrer Größe und Dichte im Wechselfeld von Zentrifugalkraft (Rotordrehung) und Zentripetalkraft (Flüssigkeitsstrom) in der

Elutriationskammer an. Die kleineren Zellen werden durch Erhöhung der Durchflussrate aus der Kammer gespült.

Die Zuordnung der Zellen zur Fließgeschwindigkeit ist dem Elutriationsprotokoll (siehe 7.2) zu entnehmen. Der Elutriator setzte sich aus einer Zentrifuge (Beckmann J2-21 M/E, UK) sowie einem Thomafluidantriebssystem (E25) zum Einladen des Puffers zusammen. Im Ruhezustand war das Schlauchsystem mit Ethanol (70%) geblockt.

Im Rahmen der Vorbereitungen wurde sowohl die Zentrifuge als das Schlauchsystem auf Funktionsfähigkeit geprüft. Nach sorgfältiger Spülung des Systems mit destilliertem Wasser erfolgte das Auffüllen mit Hank`s Puffer (2.1.1.3).

Die Isolierung der mononukleären Zellen aus den 312,5ml (250ml Blut und 62,5ml Citrat) der Vollblutspende erfolgten unter der Clean-Bench. Hierbei wurde das Blut mit PBS (2.1.1.3) auf 500ml aufgefüllt. Anschließend wurden je 40ml Blut auf zwölf Falconröhrchen (50ml) verteilt und diese mit 10ml Pancoll (Pancoll human density, 1,077g/ml, steril filtriert, PAN biotechs, Deutschland) unterschichtet. Die Unterschichtung erfolgte mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (peristaltic pump LKB Bromma, 215 Multiplex Pump, Schweden). Pancoll diente hierbei als Trennmedium. Sowohl Erythrozyten als auch Granulozyten sind der Lage dieses zu durchwandern, Lymphozyten und Monozyten (PBMCs) hingegen bleiben zurück. Im Anschluss wurde das Blut 45min bei 4°C und 1500U/min zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Rotixa 50 RS, Deutschland). Dadurch ergab sich eine Vierschichtung: 1.) Serumphase, 2.) Interphase (PBMCs, Thrombozyten), 3.) Pancoll, 4.) Granulozyten, Erythrozyten. Die Interphase wurde isoliert und auf sechs Falconröhrchen verteilt. Die sich anschließenden Schritte dienten dem Waschen der Interphase und dem Entfernen von Thrombozyten. Dies geschah mit PBS als Resuspensionsmedium. Nach dem zweiten Waschgang wurde das PMBC-Pellet in Hank`s Puffer gelöst.

Vor der eigentlichen Elutriation wurde eine Quantifizierung der PBMCs mittels Zellzähler (Sysmex Platelet Counter PL 100, Japan) durchgeführt. Das Einladen der Zellen erfolgte bei laufender Zentrifuge, 3500U/min, 4°C, die Fließgeschwindigkeit des Puffers betrug 31U/min. In den vorgeschriebenen Zeitintervallen wurde die Umdrehungszahl pro Minute sowie die Fließgeschwindigkeit erhöht, um die einzelnen Zellfraktionen nach und nach zu eliminieren. Die im letzten Elutriationsschritt gewonnenen Zellen wurden in einem Falconröhrchen aufgefangen (ca. 50ml) und für das weitere Vorgehen auf Eis gelagert.

Im Anschluss führte Frau Bergmann neben der Quantifizierung auch die Qualifizierung (FACS Calibur, FACS – Fluorescence Activating Cell Sorting, Becton Dickinson, USA) der gewonnenen Zelle durch.

2.2.4.4 Monozyten Stimulationsprotokoll

Die durch die Elutriation gewonnenen Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Vor Beginn der Stimulation wurde die Monozyten-Zellsuspension für 5min bei 4°C und 2500U/min zentrifugiert (Heraeus instruments Megafuge 1.0 R, Deutschland). Die folgenden Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen sowie auf Eis statt. Der Überstand des Zentrifugats wurde mittels Glaspipette abgenommen, verworfen und das Monozytenpellet mit RPMI + Glutamin (5%) resuspendiert. Die Zellkulturplatten (Nunclon™ Surface delta, Dänemark) wurden mit jeweils 1ml Zellsuspension/well versetzt. Ziel war es, die resuspendierten Monozyten gleichmäßig auf die einzelnen wells zu verteilen, wobei die Monozytenzahl von 7,5 Millionen/well nicht überschritten wurde. Um die Adhäsion der Zellen zu gewährleisten erfolgte eine fünfstündige Inkubation im Brutschrank, 37°C, 5% CO₂ (Heraeus instruments, cell culture incubator, Deutschland). Die Kontrolle der Adhäsion wurde mit Hilfe eines Mikroskops (Leica DM IL, Deutschland) durchgeführt. Zur Stimulation der Monozyten diente rekombinantes Human-Interleukin-1β (R&D Systems, UK), Dexamethason und Trichostatin A (Sigma-Aldrich, Deutschland).

Vor Beginn der Stimulation wurden die resuspendierten Monozyten in vier Gruppen aufgeteilt:

1. Kontrollgruppe (Kontrolle, C)
2. Stimulation mit IL-1β (1ng/ml)
3. Wie Gruppe 2 plus Zugabe von 10⁻⁸ M Dexamethason (IL-1β/DEX10⁻⁸M)
4. Wie Gruppe 3 plus Zusatz von 10μg/ml TSA (IL-1β/DEX10⁻⁸M/TSA)

Die Stimulation der Monozyten wurde in dieser Reihenfolge durchgeführt:

1.) Dexamethason, 2.) Trichostatin A, 3.) IL-1β. Im Anschluss an die Stimulation folgte eine weitere Inkubationszeit von sechs Stunden (37°C, 5% CO₂). Der Überstand von 1ml/well wurde mittels Pipette abgenommen, zentrifugiert (4°C, 2.500U/min, 5min) und bei -80°C gelagert. Der in den wells befindliche Zellrasen wurde mit Hilfe eines Zellschabers „geerntet“.

Das durch die anschließende Zentrifugation (4°C, 2.500U/min, 5min) entstandene Zellpellet wurde mit 1ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (4°C, 2.500U/min, 5min). Nach Abnehmen und Verwerfen des Überstandes wurden auch diese Proben bis zur weiteren Aufbereitung bei -80°C aufbewahrt.

2.3 Histonextraktion

Das Material für die Histonextraktion bestand aus pulverisierten Maus- und Rattenlungen sowie aus humanen Monozyten. Um die Histone aus dem Zellkern zu isolieren, wurde mit Hilfe verschiedener Puffer die Zell- und Kernmembran lysiert. Die Histonextraktion erfolgte nach Anleitung von Ito und Adcock [Ito und Adcock, 2002]. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. mit auf Eis gelagerten Reagenzien durchgeführt. Zunächst erfolgte die Herstellung von 10ml HE1-Puffer (2.1.1.4). Die eingefrorenen Zellpellets wurden in 500µl HE1 resuspendiert, 10min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (4°C, 13.000U/min, 1min). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets dreimal mit je 200µl HE1 gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Proben stets kurz zentrifugiert (4°C, 13.000U/min, 30sec) und der Überstand abpipettiert. Ebenso wurde mit dem Puffer HE2 verfahren (2.1.1.4). Die Pellets wurden mit 500µl HE2 gewaschen, zentrifugiert (4°C, 13.000U/min, 1min) und der Überstand verworfen. Die Behandlung mit HE2 diente der Entfernung von Magnesiumionen. Um die Histone aus dem Niederschlag zu lösen, wurden die einzelnen Proben mit 1M Schwefelsäure versetzt. Die Zellpellets wurden in jeweils 100µl 1M H₂SO₄ resuspendiert und 1h auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (4°C, 13.000U/min, 10min) wurde der Überstand mit den gelösten Histonen abgenommen und jede Probe mit 1,2ml Aceton versetzt. Bei einer Temperatur von -20°C erfolgte das Ausfällen der Histone über einen Zeitraum von mindestens 12h. Die ausgefallenen Histone wurden mittels Zentrifugation (4°C, 13.000U/min, 10min) isoliert und der Überstand verworfen. Das entstandene Histonpellet wurde erneut mit 1ml Aceton gewaschen sowie zentrifugiert (4°C, 13.000U/min, 10min). Im Anschluss wurde das Pellet vollständig getrocknet. Im abschließenden Schritt der Histonextraktion wurden die Proben in jeweils 20µl HE3 gelöst.

2.3.1 Proteinbestimmung im Histonextrakt

Um zu gewährleisten, dass gleiche Proteinmengen auf das Gel aufgetragen wurden, erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge im Histonextrakt.

Hierfür wurde eine Standardreihe aus BCA-Reagenz (Bicinchoninic Acid, Protein Assay, Pierce, Frankreich) hergestellt.

Für die Proteinbestimmung wurden 2µl des Histonextraktes mit 18µl 50mM Tris/HCl, pH 7,5 versetzt. Je Standard bzw. Probe wurden 4µl (Dreifachbestimmung) in eine Lochplatte (Nunclon™ delta Surface, Dänemark) pipettiert und mit jeweils 200µl Arbeitsreagenz (BC Assay Reagent A, BC Assay Reagent B, Uptima, Interchim, Frankreich) überschichtet. Nach 30minütiger Inkubation (37°C, 5% CO₂) wurde die Platte bei einer Wellenlänge von 550nm ausgelesen (Titertek Multiscan ® Plus MK II, Multiplate Reader, UK).

Die Berechnung der Standardkurve sowie der Proteinkonzentration der Proben erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism, 4.0.

2.4 Gelelektrophorese

2.4.1 Prinzip der Elektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich Proteine, Nukleinsäuren und andere Makromoleküle nach ihrer Größe, Ladung und ihren hydrophoben Eigenschaften trennen. Die Trennung der Molekülgemische erfolgt auf einem Trägergel durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, welches durch Hydrolyse von Wasser erzeugt wird. Je nach Größe und Ladung besitzt jedes Protein eine spezifische Geschwindigkeit, mit der es in dem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode „wandert“. Das Ergebnis der Elektrophorese sind im Gel sichtbare Banden, in denen sich jeweils gleiche Proteine zusammen finden. Das Auftrennen von Histonen erfolgt mit Hilfe von Harnstoffgelen (12 % AUT, engl.: acid-urea-triton) [Ito *et al.*, 2002].

Im Gegensatz zu den herkömmlichen Verfahren wird der Stromfluss bei den Harnstoffgelen umgekehrt, so dass die positiv geladenen Histone von der Anode zur Kathode wandern.

2.4.2 Probenvorbereitung

Mit Hilfe der ermittelten Proteinkonzentrationen wurden die Proben vorbereitet. Im Versuchsmodell der humanen Monozyten wurden 50µg Protein, bei den Ratten und Mäusen jeweils 10µg Protein aufgetragen.

Um das Absinken der Proben zu ermöglichen, wurden diese mit einem Probenpuffer (2.1.1.5) im Verhältnis 1:1 versetzt und 5min bei 50°C inkubiert.

2.4.3 Vorbereitung und Durchführung

Für die Gelelektrophorese wurde das Hoefer Electrophoresis System SE660, USA verwendet.

Die Zusammensetzung des Trenn- bzw. Sammelgels ist dem Anhang (7.3) zu entnehmen. Die Polymerisation des Gels wurde mit Hilfe von UV-Licht erreicht. Um das problemlose Absinken der Proben in den Geltaschen zu ermöglichen, wurden diese mit AUT-Laufpuffer (2.1.1.5) gespült. Die Proben wurden nun in entsprechender Reihenfolge in die einzelnen Taschen pipettiert. Nach dem Befüllen der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer sowie dem Einbringen des Kühlsystems, wurde die Elektrophorese gestartet. Bei 20W, 80V und 30mA/Gel benötigten die Proben ca.15h, um das Gel zu durchwandern.

2.5 Western Blot

2.5.1 Prinzip des Western Blots

Das so genannte Blotting ist eine Methode, mit der das Bandenbild einer Gelelektrophorese für Analysen verfügbar gemacht werden kann. Die Banden werden hierbei durch einen Abklatsch (= Blot) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Mit Hilfe des Western Blots wird der Nachweis eines Proteins mit einem spezifischen Antikörper ermöglicht [Königshoff und Brandenburger, 2004].

2.5.2 Vorbereitung und Durchführung

Nach dem Ende der Elektrophorese wurde das Gel 3x15min mit je 100ml Blotpuffer (2.1.1.6) äquiliert. Das Blotten wurde im Semidry-Verfahren durchgeführt (Hoefer Semiphor Blotting System, Pharmacia Biotech, Deutschland).

Es wurden Filterpapier und Filtermembranen der Firma Whatmann, Schleicher, Schuell, Deutschland genutzt.

Folgende Geräteeinstellungen wurden gewählt: 50V, 100W, 0,8mA/cm² Gel, 3h.

Nach Beendigung des Blots wurde mit Hilfe von Ponceau S (0,1%, Fluka biochemica, Fluka, Deutschland) der Transfer auf die Biomembran überprüft. War der Blot erfolgreich, so wurde ein typisches Bandenmuster sichtbar.

Des Weiteren war es möglich zu überprüfen, ob die aufgetragenen Proteinmengen homogen waren. Zum Entfärben der Membran wurde diese mit TBS (2.1.1.6) gewaschen.

Im Anschluss wurde die Membran für 1h mit Rotiblock (Roth, Karlsruhe, Deutschland) beschichtet. Rotiblock blockiert all die Bereiche der Membran, an denen sich während des Western Blots keine Proteine angelagert haben. Nach dem Entfernen des Rotiblocks folgte eine zweistündige Beschichtung mit primären Antikörpern (H4K8, H4K12). Hierbei handelte es sich um polyklonale rabbit-IgG Antikörper (Upstate, USA), die in der Lage sind, acetylierte Lysinreste an den Positionen 8 und 12 des Histons 4 zu detektieren. Die Endkonzentration der Antikörper betrug 1:2500 (8µl Antikörper, 2ml Rotiblock, 18ml TBS-T).

Um die primären Antikörper sichtbar zu machen, wurde ein sekundärer, fluoreszenzmarkierter Antikörper (anti-rabbit, 700nm, Molecular Probes, Alexa Flour, USA) verwendet. Dieser lagerte sich an die primären Antikörper an und ermöglicht dadurch die Erkennung und Auswertung. Nach einer Inkubationszeit von 1h wurde der sekundäre Antikörper entfernt. Nach jeder Inkubation mit den Antikörpern wurde die Membran 3x15min mit TBS gewaschen.

Die Auswertung der Membranen wurde mit Hilfe von Li-Cor Odyssey Imaging System (Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt.

2.6 Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

Neben der Histonacetylierung waren auch die Konzentration der Zytokine IL-6, TNF- α , MIP-2 und IL-8 Zielparameter unserer Studie. Die Bestimmung der Zytokinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Enzyme Linked Immunoabsorbent Assays (ELISA). Für die ELISAs wurden BD OptEIA™ Human ELISA Kits II der Firma BD Biosciences, USA, verwendet. Der Boden dieser Arbeitsplatten war bereits mit dem zugehörigen Interleukinantikörper beschichtet.

2.6.1 Arbeitsanleitung ELISA

Vor Versuchsbeginn wurden alle Reagenzien, ELISA-Zubehör und die zu untersuchenden Proben auf Raumtemperatur gebracht.

Um unspezifische Bindungen zu sättigen, erfolgte vorab die Zugabe von 50 μ l ELISA-Diluent. Die Proben der Überstände wurden je nach Bedarf verdünnt. Nach dem Erstellen einer Standardreihe wurden sowohl 100 μ l des Standards als auch der Proben auf die Platte (Doppelwertbestimmung) pipettiert.

Während einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die in der Probe enthaltenden Interleukine an die am Boden haftenden Antikörper gebunden. Im Anschluss wurden die wells der Platte entleert und mit je 300 μ l Waschpuffer gewaschen. Für den nächsten Arbeitsschritt wurde eine „working detection“-Lösung hergestellt. Diese bestand aus einem zweiten Antikörper sowie einem Enzymsubstrat (100 μ l/well), welches die Bindung an das bereits gebundene Antigen beschleunigte. Im Anschluss erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. In dieser Zeit lagerte sich der zweite Antikörper an das bereits gebundene Interleukin an und es kam zur Bildung eines Antikörper-Antigen-Antikörper-„sandwichs“. Die ungebundenen Antikörper wurden mit Hilfe des Waschpuffers entfernt. Um die gebundene Menge an IL-6, IL-8, MIP-2 oder TNF- α zu quantifizieren, wurden je 100 μ l Tetramethylbenzidine (TMB) One-Step Substrat hinzu gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30min (Raumtemperatur, Dunkelheit) wurde die Reaktion mit Hilfe einer Stopp-Lösung (50 μ l) unterbrochen. Die ELISAs wurden mittels ELISA-Reader bei 450nm ausgelesen. Die anschließende Auswertung wurde mit Graph Prism, 4.0, vorgenommen.

Die Untersuchung der Perfusatproben aus der IPL von Maus und Ratte erfolgte durch Dörte Karp, MTA, Forschungszentrum Borstel. Die ELISAs der humanen Monozyten wurden durch die Verfasserin dieser Arbeit durchgeführt.

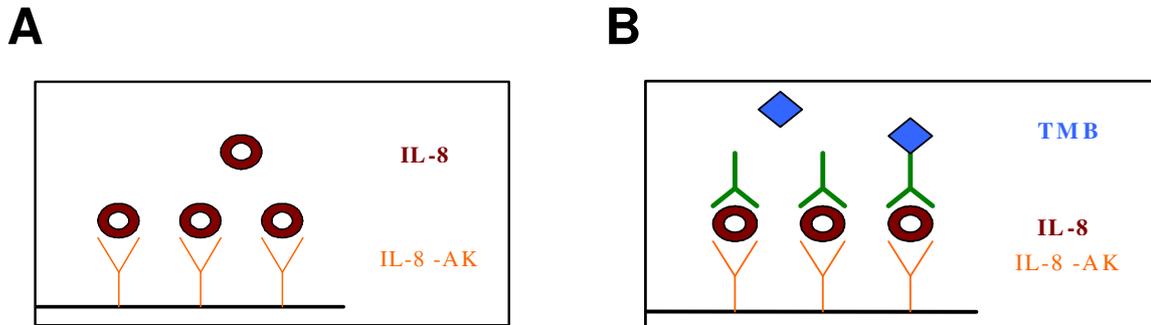


Abb. 4: Prinzip des Enzyme Linked Immunoabsorbant Assays

(modifiziert nach der Arbeitsanleitung von BD OptEIA™ Human ELISA Kits II BD Biosciences, USA) Die auf der Platte gebundenen spezifischen Antikörper (Ak) binden das in der Probe enthaltene Antigen (z.B. IL-8) (A). Nach Zugabe eines Sekundärantikörpers Ausbildung eines „sandwichs“. Die Quantifizierung des gesuchten Antigens erfolgt über die Markierung mit Tetramethylbenzidin (TMB) (B).

2.7 Statistik

Für die Auswertung der Histonacetylierung (Abb. 6, 10, 14) wurden die absoluten Werte der Fluoreszenzintensitäten von H4K8 und H4K12 relativiert und mit Hilfe des unpaarigen, einseitigen t-Tests (Prism 4.00, Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA) verglichen.

Folgende Vergleiche wurden vorgenommen:

1. Ratten: LPS vs. LPS/TSA; LPS vs. LPS/DEX, LPS/DEX vs. LPS/DEX/TSA
2. Mäuse: NV vs. OV; OV vs. OV/DEX, OV/DEX vs. OV/DEX/O₂
3. Humane Monozyten: C vs. IL-1 β ; IL-1 β vs. IL-1 β /DEX10⁻⁸M; IL-1 β /DEX10⁻⁸M vs. IL-1 β /DEX10⁻⁸M/TSA

Multiple Vergleiche wurden mittels false discovery rate (fdr) kontrolliert (R 2.0 [The R project for statistical computing]). Ebenso wurde bei der Auswertung der Zytokine im humanen Monozytenmodell (Abb. 15) verfahren.

Für die Auswertung der Zytokinkonzentrationen (Abb. 7, 12) im Modell der IPL der Ratten und Mäuse wurden die Zeitverläufe der Zytokine gemessen. Hierfür verwendeten wir eine ein-faktorielle Mixed Model-Analyse mit Messwiederholung und Anpassung der Varianzen (1-factorial mixed model analysis for repeated measurements with heterogeneous variances; PROC MIXED in SAS 9.1).

Hierbei wurden folgende Vergleiche durchgeführt:

1. Ratten: LPS vs. LPS/TSA, LPS vs. LPS/DEX, LPS/DEX vs. LPS/DEX/TSA
2. Mäuse: NV vs. OV, OV vs. OV/DEX, OV/DEX vs. OV/DEX/O₂

Die statistische Auswertung der Beatmungsparameter erfolgte mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse (one-way ANOVA), der sich eine p-Wert-Korrektur mittels fdr anschloss. Es wurden die oben angegebenen Vergleiche durchgeführt.

Alle Daten sind als Mittelwert (MW) \pm SEM dargestellt. Folgende Signifikanzniveaus wurden verwendet: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

3. Ergebnisse

3.1 Isoliert perfundierte Rattenlunge

Mit Hilfe des Modells der isoliert perfundierten Rattenlunge wurde die anti-entzündliche Wirkung von Glukokortikoiden überprüft, bzw. der Wirkmechanismus der Steroidhormone über die HDAC nachvollzogen. Ein weiteres Ziel des Versuchsaufbaus war es, durch unspezifische Inhibition der HDAC die Wirkung von oxidativem Stress nachzuempfinden und dadurch das Phänomen der Steroidresistenz zu provozieren. Die Inhibition der HDAC erfolgte durch die Gabe von TSA.

3.1.1 Beatmungsparameter

Zu Beginn der Beatmung betrug das mittlere Tidalvolumen in allen Gruppen etwa 1,9ml (Tab. 1). Über den gesamten Zeitraum hinweg kam es zu einem kontinuierlichen Absinken der Tidalvolumina. In der LPS-Gruppe wurde dies besonders deutlich. Zu Beginn des Versuchs war der Atemwegswiderstand (Resistance) der Gruppen vergleichbar. Nach Gabe von LPS kam es zu einem deutlichen Anstieg des Widerstandes, welcher durch die zusätzliche Gabe von Dexamethason abgeschwächt wurde. TSA allein hatte keinen Einfluss auf die Beatmung.

Parameter	Zeit [min]	C (n=3)	C/TSA (n=3)	LPS (n=3)	LPS/TSA (n=3)	LPS/DEX (n=6)	LPS/DEX/TSA (n=6)
Tidalvolumen	0	1.94±0.03	1.91±0.06	1.88±0.03	1.96±0.09	1.92±0.05	1.89±0.06
Tidalvolumen	30	1.78±0.02	1.73±0.12	1.69±0.03	1.77±0.14	1.75±0.09	1.73±0.06
Tidalvolumen	180	1.40±0.05*	1.26±0.33	0.90±0.21	1.18±0.37	0.98±0.23	1.28±0.14
Resistance	0	0.279±0.004	0.269±0.00	0.281±0.007	0.275±0.006	0.275±0.004	0.272±0.015
Resistance	30	0.280±0.003	0.270±0.003	0.285±0.009	0.278±0.005	0.277±0.004	0.274±0.006
Resistance	180	0.291±0.007*	0.284±0.015	0.338±0.039	0.300±0.015*	0.312±0.019*	0.287±0.009†

Tabelle 1: Beatmungsparameter IPL Ratte

Parameter Tidalvolumen und Resistance zu den Zeitpunkten 0, 30 und 180min. Abkürzungen: Kontrolle (C), Trichostatin A (TSA, 100ng/ml), Lipopolysaccharide (LPS; 50µg/ml), Dexamethason, (DEX10⁻⁶M, 10⁻⁸M). Folgende Vergleiche wurden angestellt: C vs. TSA, C vs. LPS, LPS vs. LPS/DEX, LPS/DEX vs. LPS/DEX/TSA. Alle Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt. n=24. *: p<0,05 vs. LPS; †: p<0,05 vs. LPS/DEX.

3.1.2 Histonacetylierung

Nach der Gabe von TSA kam es zu einer signifikanten Steigerung der Acetylierung an H4K8 (Abb. 5A). Dieser Effekt war bei der Kombination LPS/DEX/TSA am intensivsten ausgeprägt. An Position H4K12 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

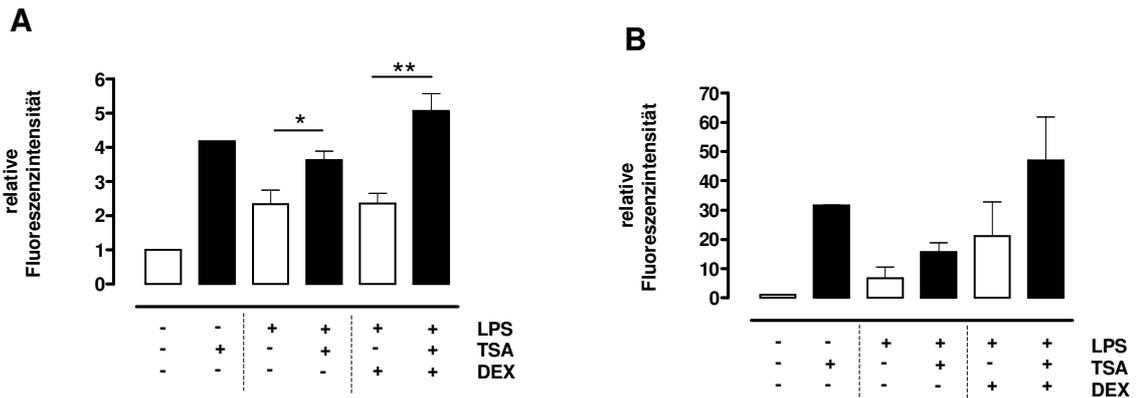


Abb. 5: Acetylierung des Histons 4 an den Lysinresten 8 und 12

Die Intensität der Acetylierung an der Position H4K8 (A) und H4K12 (B) wurde mittels relativer Fluoreszenzintensität (Kontrolle=1) dargestellt. LPS vs. LPS/TSA, LPS vs. LPS/DEX, LPS/DEX vs. LPS/DEX/TSA. $M \pm SEM$, $n=24$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

3.1.3 Zytokinfreisetzung

Neben der Histonacetylierung erlaubt auch die Messung der Zytokinkonzentration einen Rückschluss auf die Transkriptionsaktivität.

In Abbildung 6 ist der Einfluss von TSA auf LPS stimulierte Rattenlungen dargestellt. Die alleinige Perfusion der Rattenlunge mit TSA hatte keinen Einfluss auf die Zytokinkonzentrationen von IL-6 (Abb. 6A) und TNF- α (Abb. 6B). Lediglich bei MIP2 (Abb. 6C) kam es zu einem geringen Anstieg. LPS induzierte einen deutlichen Anstieg der Konzentrationen von IL-6, TNF- α , und MIP2 (Abb. 6A-C). Dieser Anstieg wurde durch die Zugabe von TSA vermindert.

Der Einfluss von Dexamethason auf Stimulation mit LPS bzw. die Behandlung mit TSA wird in Abbildung 7 gezeigt. Die Gabe von Dexamethason verminderte die Freisetzung aller drei Zytokine (Abb. 7).

Im Hinblick auf IL-6 konnte dieser Effekt durch TSA verstärkt werden, während sich die Konzentrationen von MIP-2 und TNF- α unter der zusätzlichen Gabe von TSA nicht signifikant veränderten.

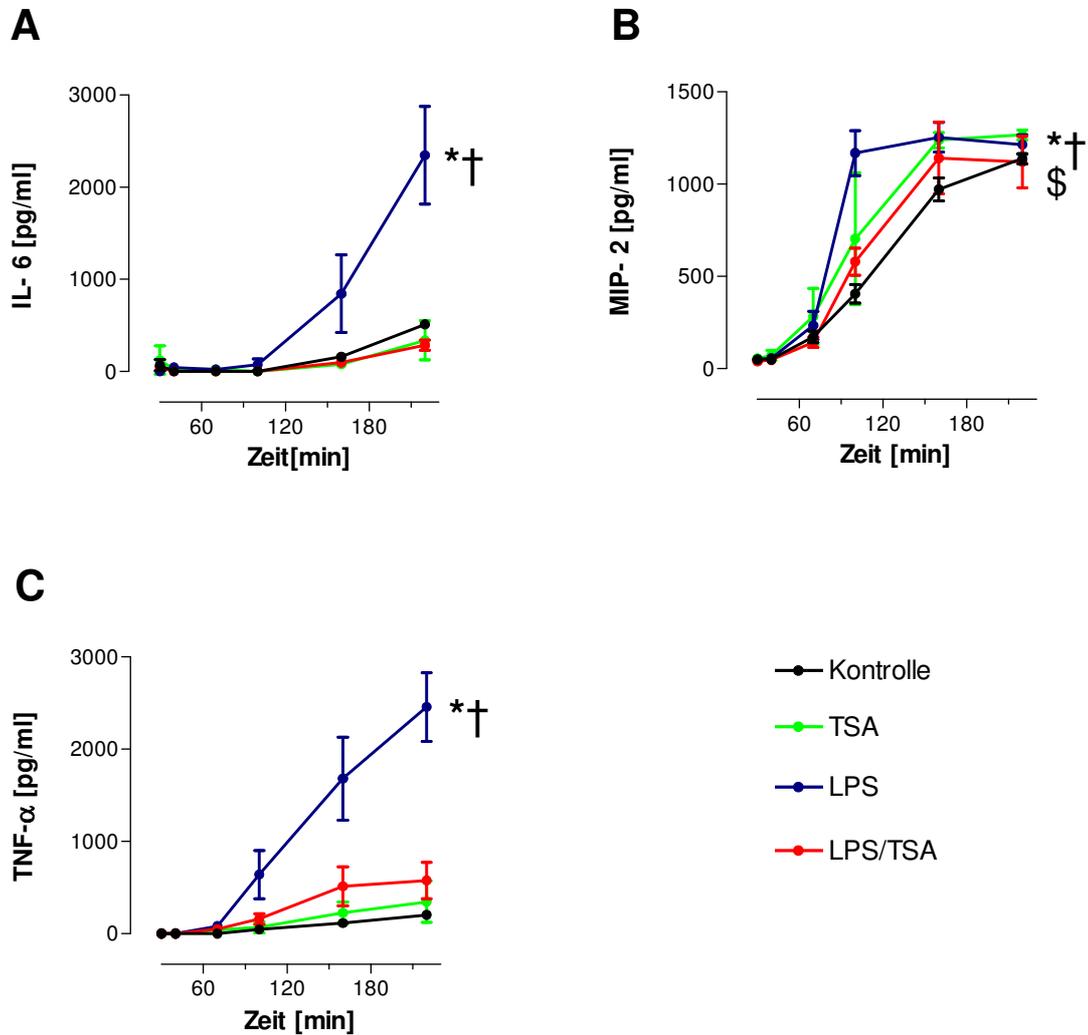


Abb. 6: Auswirkung von TSA auf die Zytokinkonzentration in LPS-stimulierten Rattenlungen

Konzentrationen von IL-6 (A), MIP2 (B) und TNF- α (C) im Perfusat nach Stimulation mit Trichostatin A (TSA) und/oder Lipopolysacchariden (LPS). $p < 0,05$: \$: Kontrolle vs. TSA, *: Kontrolle vs. LPS, †: LPS vs. LPS/TSA. $M \pm SEM$, $n = 18$.

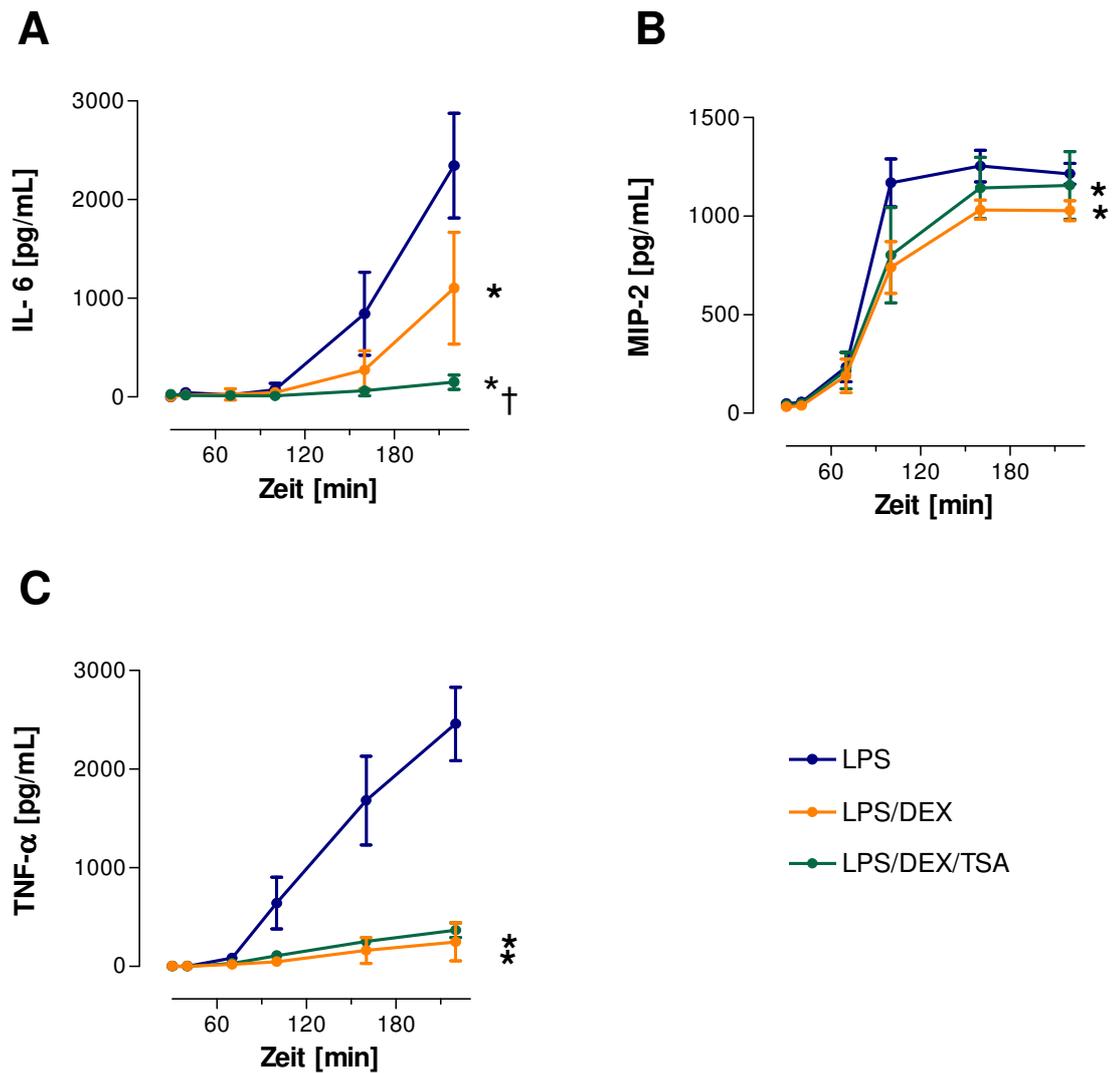


Abb. 7: Einfluss von Dexamethason und TSA auf die Zytokinkonzentration in LPS-stimulierten Rattenlungen

Perfusatkonzentrationen von IL-6 (A), MIP-2 (B) und TNF- α (C) nach Zugabe von Dexamethason (DEX $10^{-6}M$, $10^{-8}M$; Zusammenschluss der Daten). $p < 0,05$: *: LPS vs. LPS/DEX und LPS vs. LPS/DEX/TSA; †: LPS/DEX vs. LPS/DEX/TSA. $M \pm SEM$, $n = 15$.

3.2 Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge

Ziel des nachfolgenden Experiments war es zu untersuchen, wie sich oxidativer Stress in Form von hochkonzentriertem Sauerstoff ($\text{FiO}_2 1,0$, Fraction of inspired oxygen 1,0) auf den anti-entzündlichen Steroideffekt im Modell der beatmungsinduzierten Zytokininduktion auswirkt.

3.2.1 Beatmungsparameter

Die Tidalvolumina der Kontrollgruppe blieben über den gesamten Zeitraum von 180min (variierte Bedingungen) nahezu konstant (Tab. 2). Die Beatmung mit hohem end-inspiratorischem Druck hatte eine deutliche Erhöhung der Tidalvolumina zur Folge. Während zu Beginn des Versuchs die Resistance in allen vier Gruppen vergleichbar war, kam es nach Modifikation der Versuchsbedingungen ($P_{\text{insp}} -22,5\text{cmH}_2\text{O}$, OV) zu einem Anstieg des Atemwegswiderstandes. Die Perfusion mit Dexamethason sowie die Ventilation mit $\text{FiO}_2 1,0$ hatten keinen Einfluss auf die Resistance.

Parameter	Zeit [min]	C (n=8)	OV (n=8)	OV/DEX (n=11)	OV/DEX/O ₂ (n=10)
Tidalvolumen	0	0.28±0.02*	0.30±0.03	0.28±0.03*	0.31±0.02
Tidalvolumen	30	0.27±0.02*	0.70±0.08	0.68±0.10	0.76±0.07
Tidalvolumen	180	0.24±0.02*	0.37±0.07	0.38±0.07	0.39±0.07
Resistance	0	0.29±0.06	0.33±0.08	0.34±0.15	0.34±0.15
Resistance	30	0.30±0.06	0.25±0.03	0.26±0.07	0.22±0.10
Resistance	180	0.37±0.07*	1.65±0.45	1.32±0.26	1.40±0.33

Tabelle 2: Beatmungsparameter IPL Maus

Tidalvolumen und Resistance zu den Zeitpunkten 0, 30 und 180min. Kontrolle (C, P_{insp} -10cmH₂O), P_{insp} -22,5cmH₂O (OV), Dexamethason (DEX, 10⁻⁶M, 10⁻⁸M), Ventilation mit F_iO₂ 1,0 (O₂). Es ergaben sich folgende Vergleiche: C vs. OV, OV vs. OV/DEX, OV/DEX vs. OV/DEX/O₂. *:p<0,05 vs. OV; †: p<0,05 vs OV/DEX. M±SEM. n=37.

3.2.2 Histonacetylierung

In Abbildung 8 ist die Acetylierung an den Lysinresten 8 und 12 dargestellt. Die Ventilation mit erhöhtem end-inspiratorischem Beatmungsdruck hatte keine signifikante Änderung der Acetylierung zur Folge. Auch die Perfusion mit Dexamethason sowie die Beatmung mit FiO_2 1,0 zeigten keinen signifikanten Effekt.

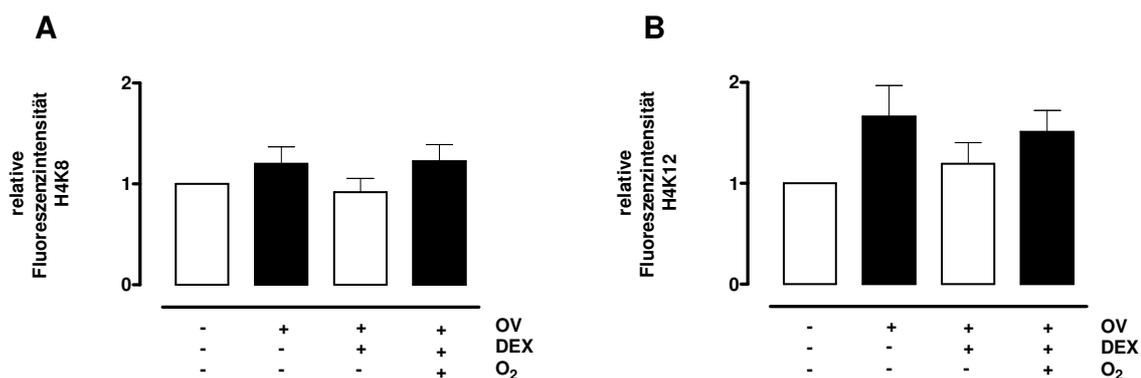


Abb.8: Acetylierung an H4K8 und H4K12

Mit Hilfe der Fluoreszenzintensität wurde der Acetylierungsgrad an H4K8 (A) und H4K12 (B) bestimmt. Folgende Vergleiche ergaben sich: C vs. OV, OV vs. OV/DEX; OV/DEX vs. OV/DEX/O₂. $M \pm SEM$. $n=37$.

3.2.3 Zytokinfreisetzung

Die Überbeatmung führte bei IL-6, TNF- α und MIP-2 zu einer deutlichen Erhöhung der Konzentrationen (Abb. 9A-C). Eine Vorbehandlung mit Dexamethason bewirkte eine signifikante Abnahme der einzelnen Zytokinkonzentrationen. Unter der Beatmung mit FiO_2 1,0 konnte der entzündungshemmende Effekt von Dexamethason aufgehoben werden. Dies war sowohl bei IL-6 (Abb. 9A), MIP-2 (Abb. 9B) als auch bei TNF- α (Abb. 9C) zu beobachten.

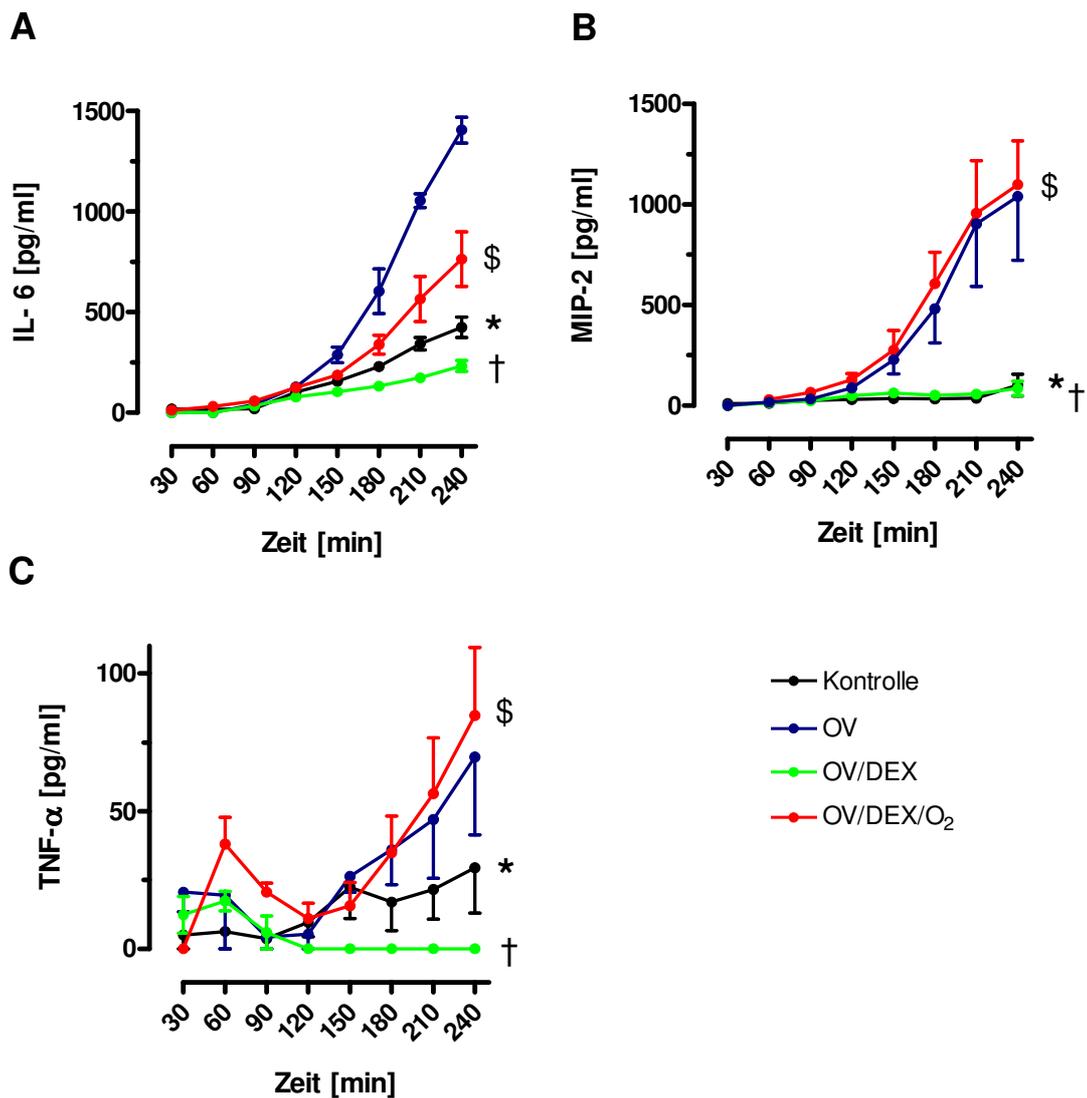


Abb. 9: Zytokinkonzentrationen der IPL Maus

Abgebildet sind die Konzentrationen von IL-6 (A), MIP-2 (B) und TNF- α (C) im Perfusat. Kontrolle (C), OV (Overventilation, P_{insp} -22,5cmH₂O), Dexamethason (DEX, 10^{-6} M und 10^{-8} M), Beatmung mit FiO_2 1,0 (O₂). Ergaben sich beim Vergleich der Gruppen Signifikanzen ($p < 0,05$) wurden sie in der Abbildung entsprechend dargestellt: *: C vs. OV; †, OV vs. OV/DEX; \$: OV/DEX vs. OV/DEX/O₂. $M \pm SEM$. $n=37$.

3.3 Humane Monozyten

An der Studie des „Humanen Monozytenmodells“ nahmen 25 Probanden im Alter von 20-60 Jahren teil. Das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug 13:12. In die abschließende Auswertung wurden sechs Probanden eingeschlossen (m:w, 4:2).

3.3.1 Einschlusskriterien

Um die Gesundheit der Probanden zu dokumentieren, wurden die in Tabelle 3 dargestellten Parameter herangezogen und mit anerkannten Normwerten verglichen.

Parameter	Norm	= Norm	> Norm	< Norm
systolischer Blutdruck ⁺	< 140 mmHg	20	5	0
diastolischer Blutdruck ⁺	< 90 mmHg	24	1	0
Vitalkapazität*	> 80%	24	0	1
FEV1*	> 80%	24	0	1
Hämoglobin (w/m) [#]	12-16/14-18 [g/dl]	25	0	0
Leukozyten [#]	4000-9000/μl	25	0	0

Tabelle 3: Charakteristika der Probanden

Untersuchungsparameter der Probanden bei Studieneinschluss: systolischer und diastolischer Blutdruck (mmHg), Lungenfunktion (Vitalkapazität; FEV1, Einsekundenkapazität), Laborparameter Hämoglobin (g/dl) und Leukozyten/μl. Verglichen wurden die Werte der Probanden mit anerkannten Richtwerten. ⁺, [Deutsche Hochdruckliga e.V.], ^{}, [Deutsche Atemwegsliga e.V.], [#], validierte Laborparameter des UKSH Campus Lübeck (7.7.1). m, männlich; w, weiblich.*

Die im Differentialblutbild ermittelte Anzahl an Monozyten betrug 375±175/μl (M±SEM). Mit Hilfe der Elutriation konnten 47±24 Millionen Monozyten gewonnen werden. Die Reinheit der Zellen betrug 92±4%.

3.3.2 Ausschluss von Probanden

Insgesamt wurden 25 Probanden in die Studie aufgenommen. Die Ergebnisse von sechs Teilnehmern gingen in die Auswertung ein. Für das Ausscheiden sind Änderungen in der Methode (n=2), unzureichende Zellzahl (<30 Millionen Monozyten, n=6) sowie Fehler in der Analyse (n=2) verantwortlich. Die Zytokinkonzentrationen wurden in einer Doppelbestimmung ermittelt. Die übrigen Probanden wurden wegen mangelnder Reproduktion der Ergebnisse bei der Doppelbestimmung (n=9) ausgeschlossen.

3.3.3 Histonacetylierung

Die Stimulation mit IL-1 β sowie die Behandlung mit Dexamethason 10⁻⁸M und TSA hatten keinen signifikanten Effekt auf die Acetylierung an H4K8 (Abb. 10A). Im Gegensatz dazu bewirkte IL-1 β an H4K12 eine signifikante Verstärkung der Acetylierung. Die Zugabe von Dexamethason (DEX10⁻⁸M) bzw. TSA erzielte hingegen keine signifikante Veränderung.

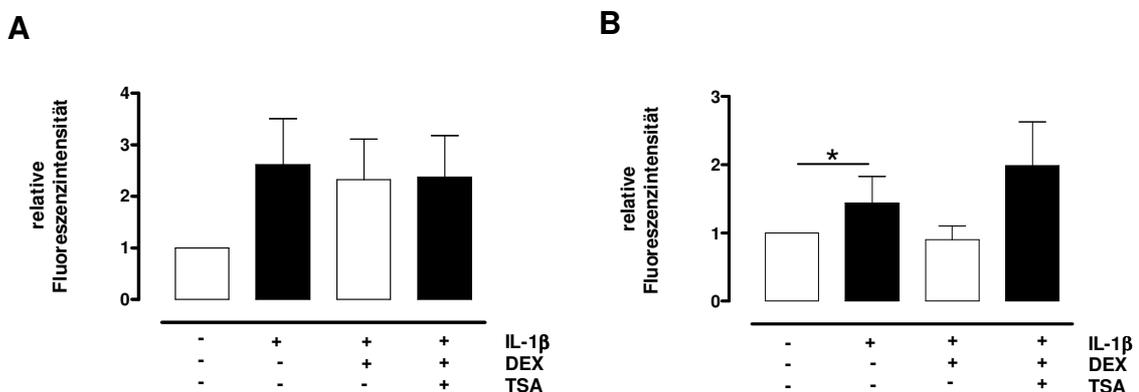


Abb. 10: Acetylierung des Histons 4 an den Lysinresten 8 (A) und 12 (B)

Abkürzungen: Kontrolle (C), Stimulation mit Interleukin-1 β (IL-1 β , 1ng/ml), Dexamethason 10⁻⁸M (DEX), Trichostatin A (TSA, 10 μ l/ml). Bei den Daten handelt es sich um relative Werte in Bezug auf die Kontrollgruppe, C=1. Vergleiche zwischen den Gruppen: C vs. IL-1 β , IL-1 β vs. DEX, IL-1 β /DEX vs. IL-1 β /DEX/TSA. M \pm SEM. *: p<0,05. n=6.

3.3.4 Zytokinfreisetzung

Die Stimulation mit IL-1 β bewirkte einen Anstieg der Konzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF- α . Unter Gabe von Dexamethason kam es zu einer Reduktion der Mediatoren IL-6 und TNF- α . Die Konzentration an IL-8 hingegen wurde nicht signifikant beeinflusst. TSA bewirkte keine Änderung in der Zytokinproduktion (Abb. 11).

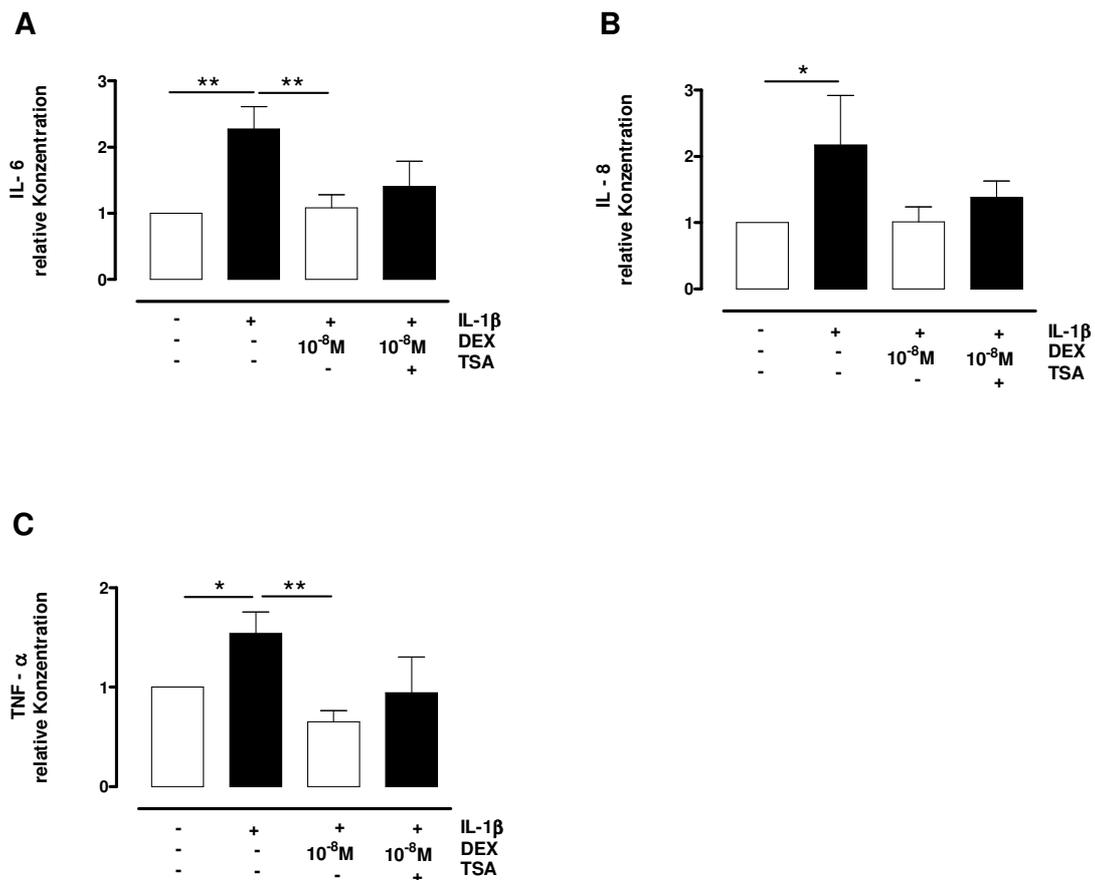


Abb. 11: Zytokinfreisetzung der humanen Monozyten

Konzentrationen von IL-6 (A), IL-8 (B) und TNF- α (C). Folgende Vergleiche wurden angestellt: C vs. IL-1 β , IL-1 β vs. DEX, IL-1 β /DEX vs. IL-1 β /DEX/TSA. Die Ergebnisse sind als relative Werte in Bezug auf die Kontrollgruppe dargestellt, C=1. M \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. n=6.

4. Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung des Zusammenspiels von entzündlichen Stimuli, Dexamethason und oxidativem Stress. Von besonderem Interesse war hierbei die Frage, ob oxidativer Stress in Form von Sauerstoff in der Lage ist, eine Steroidresistenz zu verursachen. Hierfür kamen drei Modelle zur Anwendung: 1.) IPL Ratte, 2.) IPL Maus und 3.) Humanes Monozytenmodell. Die Acetylierung und Deacetylierung von Histonen spielt bei der Expression von Genen eine wesentliche Rolle. Während die Histonacetylierung die Transkription der DNA zur Folge hat, beendet die Histondeacetylierung diesen Prozess. So führen Entzündungsstimuli zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche ihrerseits Histonacetylasen aktivieren. Es kommt zur Expression von weiteren pro-entzündlichen Mediatoren. Steroide entfalten ihre entzündungshemmende Wirkung über die Aktivierung der HDAC2. Unmittelbare Folge der HDAC2-Aktivierung ist die Deacetylierung von acetylierten Lysinresten und somit die Inhibition der Transkription. Der anti-inflammatorische Effekt von Dexamethason ist demnach abhängig von der Aktivität der HDAC2 [Ito *et al.*, 2000; Ashburner *et al.*, 2001]. Dennoch ist die anti-entzündliche Wirkung von Steroiden begrenzt, da vor allem bei COPD-Patienten auch ein Nichtansprechen auf die Steroidhormongabe beobachtet wurde. Mögliche Ursache für diese so genannte Steroidresistenz ist oxidativer Stress, welcher durch die Inaktivierung der HDAC2 die Wirksamkeit der Steroide herabsetzt [Ito *et al.*, 2001; 2004].

Grundlage der Arbeit war die Annahme, dass pro-inflammatorische Stimuli (IL-1 β , LPS, alveoläre Überdehnung) zu einer vermehrten Histonacetylierung und Zytokinfreisetzung führen, diese Effekte mit Hilfe von Dexamethason supprimierbar sind und schließlich durch oxidativen Stress beeinflusst werden können .

In den Modellen der Isoliert perfundierten Ratten- und Mauslunge hatte die Perfusion mit LPS sowie die Beatmung mit erhöhtem end-inspiratorischen Druck sowohl bei H4K8 als auch bei H4K12 lediglich eine Tendenz, die Histonacetylierung zu intensivieren. Im humanen Monozytenmodell konnte unter Stimulation mit IL-1 β eine Zunahme der Acetylierung bei H4K12 verzeichnet werden. Außerdem führten LPS, Überdruckbeatmung und IL-1 β zu einer deutlichen Steigerung der Konzentration aller ermittelten Entzündungsmediatoren.

Der supprimierende Einfluss von Dexamethason auf die Histonacetylierung konnte im IPL-Modell der Ratte und Maus nicht eindeutig gezeigt werden. Dies bestätigt die Daten von Dombrowsky und Uhlig [Dombrowsky und Uhlig, 2007]. Auch im Modell der humanen Monozyten zeigte Dexamethason keinen Einfluss auf die Histonacetylierung. Im Hinblick auf die Entzündungsmediatoren konnte Dexamethason die gesteigerte Expression allerdings signifikant hemmen. Durch diese Ergebnisse werden drei wesentliche Punkte deutlich: Erstens, alle drei Modelle sind dafür geeignet, die Aktivierung von Entzündungsmediatoren zu untersuchen. Zweitens korrelieren die Ergebnisse der verschiedenen Modelle miteinander. Drittens, legen die vorliegenden Daten nahe, dass Dexamethason seine anti-entzündliche Wirkung nicht vorrangig über den Einfluss auf die HDAC entfaltet.

Die Diskrepanz zwischen Histonacetylierung und Zytokinkonzentration wirft die Frage auf, welches der eigentliche Schlüsselmechanismus der Steroidwirkung ist. Alle bisher beschriebenen Mechanismen zielen darauf ab, die Genexpression zu unterdrücken. Einige wirken über eine reduzierte Histonacetylierung (HDAC2-Rekrutierung, AP-1/ NF- κ B-Suppression), andere über die Bindung an die Promotoregion der Genabschnitte, die pro-entzündliche Mediatoren kodieren. In der von uns aufgestellten Hypothese koppelten wir den Effekt von Dexamethason an die Aktivität der HDAC 2. Durch eine Blockade dieser müsste, unserer Hypothese zufolge, der Effekt von Dexamethason aufgehoben werden.

In unserer Studie verwendeten wir den spezifischen HDACi TSA. Dieser fand sowohl im IPL-Modell der Ratte als auch im Modell der humanen Monozyten Anwendung. Im Monozytenmodell führte die Gabe von TSA weder auf der Ebene der Histonacetylierung noch im Bezug auf die Zytokinkonzentrationen zu Veränderungen. Im Gegensatz dazu konnte am Modell der Ratte gezeigt werden, dass die Gabe von TSA die Histonacetylierung an H4K8 signifikant steigerte. Demnach würde man auch eine Steigerung der Zytokinkonzentrationen erwarten. Lediglich bei MIP-2 kam es zu einer Steigerung der Konzentration. Im Gegensatz dazu führte die Kombination von LPS und TSA zu einer verminderten Produktion von IL-6, MIP-2 und TNF- α . Vergleichbare Ergebnisse konnten in einer ähnlichen Untersuchung von Leoni et al. bereits 2002 gezeigt werden [Leoni *et al.*, 2002]. Das bedeutet, dass TSA zwar Einfluss auf die Histonacetylierung nimmt, die Intensität und Richtung der Wirkung aber nicht unbedingt vorhersehbar ist.

Wie bereits beschrieben nimmt TSA lediglich auf einen kleinen Teil der Gene Einfluss. Die TSA-Gabe kann sowohl zur verstärkten, als auch zur verminderten Expression führen [Van Lint *et al.*, 1996]. Im Gegensatz zu Zellkulturen und -linien zeigt TSA in *in vivo* Studien auch eine anti-inflammatorische Wirkung [Leoni *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005].

Demnach scheint die TSA-Gabe einerseits gewebeabhängig zu sein, andererseits kann man davon ausgehen, dass TSA als HDACi nicht nur über die Histonacetylierung wirkt, sondern auch anderweitig Einfluss auf die Aktivität von Genen nimmt.

Der fehlende Nachweis des direkten Zusammenhangs zwischen der HDAC-Aktivität und der Dexamethasonwirkung zeigt, dass das Zusammenspiel zwischen entzündlichen Stimuli und Dexamethason weitaus komplexer sein muss. Um dieser Frage nachzugehen, sind weitere Untersuchungen notwendig, die auch andere Wirkmechanismen der Glukokortikoide berücksichtigen. So sollte zum Beispiel die Aktivität von GREs, die Konzentrationen von NFkB- und AP1 sowie anti-inflammatorischer Zytokine (IL-1, Lipocortin) überprüft werden.

Im Fokus unserer Untersuchungen stand weiterhin der Einfluss von oxidativem Stress auf die Steroidwirkung. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, geht oxidativer Stress (Rauchen, Entzündung) mit einer Abnahme der HDAC2-Aktivität und mangelnder Steroidhormonwirkung einher [Ito *et al.*, 2001; 2004; 2005]. In unseren Versuchen wurde oxidativer Stress durch die Beatmung mit medizinischem Sauerstoff (FiO₂ 1,0) ausgelöst, bzw. über eine direkte HDAC-Inhibition durch TSA-Gabe simuliert. Im IPL-Modell der Maus war es möglich, eine alveoläre Überdehnung mit hochkonzentrierter Sauerstoffbeatmung (FiO₂ 1,0) zu kombinieren und somit eine klinische relevante Situation zu imitieren. Hinsichtlich der Histonacetylierung kam es unter Sauerstoffapplikation zu keiner signifikanten Veränderung. Da aber zuvor weder die Überdruckbeatmung noch die Gabe von Dexamethason einen sichtbaren Einfluss auf die Histonacetylierung genommen haben, ist auch der Effekt von Sauerstoff nur bedingt zu beurteilen. Um den Einfluss von Sauerstoff auf die Steroidwirkung endgültig abzuschätzen, müssen die Ergebnisse der Zytokinkonzentrationen einbezogen werden. Die Überdruckbeatmung führte sowohl bei IL-6, MIP-2 als auch bei TNF- α zu einer deutlichen Steigerung der Konzentrationen. Dieser Effekt konnte durch die Gabe von Dexamethason unterdrückt werden.

Interessanterweise führte die Beatmung mit Sauerstoff in Kombination mit Dexamethason erneut zu einem deutlichen Anstieg der Zytokine.

Oxidativer Stress in Form von Sauerstoff ist demnach in der Lage, die Wirkung von Steroiden zu hemmen und eine Steroidresistenz zu provozieren. Unsere Hypothese basierte auf der Vorstellung, dass Sauerstoff über die Inaktivierung von Histondeacetylasen Einfluss auf die Steroidwirkung nehmen kann. Da die Ergebnisse der Histonacetylierung nicht mit denen der Zytokinkonzentrationen korrelieren, ist anzunehmen, dass sowohl der Hauptangriffspunkt der Glukokortikoide, als auch der Einfluss von Sauerstoff an einer anderen Stelle als der HDAC2 stattfinden muss.

4.1 Methodische Diskussion

Die Rolle der Histonacetylierung hat im Lauf der vergangenen Jahre eine immer größer werdende Bedeutung im Bereich der Entzündungsforschung erfahren. Sie wurde als zentraler Mechanismus im Zusammenspiel von entzündlichen Stimuli und Steroidwirkung angesehen. Demnach schien die Histonextraktion sowie die Messung des Acetylierungsgrades das optimale Instrument, um die von uns gestellten Hypothesen zu untersuchen. Als Material bisheriger Studien wurden Zelllinien und -kulturen sowie Tiermodelle verwendet.

Im Mittelpunkt unserer Arbeit standen zwei verschiedene Modelle für entzündliche Lungenerkrankungen. Im IPL-Modell der Ratte wurde die Entzündungsreaktion durch die Gabe von LPS induziert und die Wirkung von Dexamethason und TSA auf Histonacetylierung und Zytokinkonzentration überprüft. Auch anhand der Beatmungsparameter ließ sich die Inflammation nachvollziehen. LPS führte zu einer Abnahme der Tidalvolumina sowie zu einem Anstieg der Resistance. Diese Effekte wurden wie erwartet durch die Gabe von Dexamethason aufgehoben [Uhlig *et al.*, 1996]. Im zweiten Tierversuch (IPL Maus) erfolgte die Entzündungsinduktion mittels erhöhter end-inspiratorischer Beatmungsdrücke. Dies führte neben erhöhten Tidalvolumina auch zu einem Resistanceanstieg.

Im Vordergrund stand hierbei die strukturelle pulmonale Schädigung als Ausgangspunkt des Entzündungsgeschehens. Die Gabe von Dexamethason hatte keinen Effekt auf die Beatmungsparameter.

Im Modell der humanen Monozyten führte die Stimulation mit IL-1 β zu einer Steigerung der Histonacetylierung und der Entzündungsmediatoren. Betrachtet man die drei vorliegenden Modelle, so wird deutlich, dass ausschließlich beim humanen Monozytenmodell eine Korrelation zwischen der Histonacetylierung und der Expression an Entzündungsmediatoren besteht.

Dombrowsky und Uhlig konnten in Vorversuchen zeigen, dass die Beatmung mit -22,5mmHg im Gegensatz zu -10mmHg zu einer Steigerung der Histonacetylierung an H4K12 führt und die Produktion der genannten Mediatoren verstärkt [Dombrowsky und Uhlig, 2007]. Bei den durchgeführten Versuchen war es nicht möglich, diese Ergebnisse vollständig zu reproduzieren. Ursache hierfür ist ein statistisches Problem. Infolge großer Varianzen war die statistische Power zu gering. In Bezug auf die Zytokinproduktion konnten die Ergebnisse von Dombrowsky und Uhlig bestätigt werden. Neben zahlreichen Tierversuchen [Dombrowsky und Uhlig, 2007] wurden auch klinische Studien durchgeführt. Als Material dienten hierbei vor allem Alveolarmakrophagen, die mit Hilfe einer Bronchoalveolären Lavage (BAL) gewonnen wurden. Keatings konzentrierte sich bei ihren Studien vorrangig auf Zytokinkonzentrationen [Keatings *et al.*, 1996; 1997], während Ito auch die Anwesenheit und Aktivität von HDACs sowie den Acetylierungsgrad der Histone untersuchte [Ito *et al.*, 2001; 2004; 2005]. Da die BAL zur Gewinnung von Alveolarmakrophagen ein invasives Verfahren darstellt und die Zellausbeute stark variieren kann, suchten wir eine Möglichkeit mit geringerem Aufwand eine ausreichend große Zellzahl gewinnen zu können. Die Monozyten des Blutes erschienen hierfür besonders geeignet. Die Elutriation der Monozyten ist ein Verfahren, welches durch die Zahl der Monozyten im Blut, die individuell verschieden ist, limitiert wird. Um eine erfolgreiche Durchführung der Versuche zu ermöglichen, waren je Proband mindestens 3×10^7 Monozyten notwendig. Bei sechs der 25 Probanden waren nur unzureichend Monozyten zu elutrieren. Des Weiteren ließ sich trotz klinischer Untersuchungen eine Vorstimulation der Monozyten nicht ausschließen. Dies hat jedoch im Hinblick auf die Histonacetylierung und die Zytokinkonzentrationen eine immense Auswirkung auf die Intensität der Stimulationsantwort.

Aufgrund des geringen Zellmaterials waren wir auf eine begrenzte Anzahl von Versuchsgruppen angewiesen. So wäre es auch interessant gewesen, die alleinige Wirkung von TSA auf die Histonacetylierung zu untersuchen.

Trotz der Schwierigkeiten konnten wir zeigen, dass die Messung der Histonacetylierung auch an humanen Monozyten möglich ist und somit für weiterführende klinische Studien praktikabel erscheint. In unseren Versuchen führte die Stimulation mit IL-1 β auf Histonebene zu einer verstärkten Acetylierung von H4K12 sowie einem Anstieg der Zytokinkonzentrationen. Dieser Anstieg war durch die Gabe von Dexamethason reversibel. Damit konnten wir Parallelen zu Ito et al. [Ito *et al.*, 2000] aufzeigen. Dieser beschrieb im Jahr 2000, dass die Stimulation von Alveolarmakrophagen mit IL-1 β eine Steigerung der Histonacetylierung und Entzündungsmediatoren zur Folge hat. In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Bestimmung der Histonacetylierung und Zytokinkonzentrationen auch an peripher isolierten Monozyten möglich ist und nicht nur mit Hilfe von Zelllinien und -kulturen. Eine vergleichbare Studie gab es bisher noch nicht. Die Tatsache, dass man sich nicht nur gewebespezifische, sondern auch systemische Zellen im Entzündungsmodell zunutze machen kann, hat für kommende Studien eine große Relevanz. So spielt bei Untersuchungen zum Thema Sepsis, als Beispiel für eine systemische Erkrankung, die Veränderungen an systemische Zellen eine wesentliche Rolle.

5. Zusammenfassung

Die Chronisch Obstruktive Bronchitis (COPD) ist ein Krankheitsbild, dessen Prävalenz, Morbidität und Mortalität im kommenden Jahrzehnt deutlich zunehmen wird. Bereits im Jahr 2020 wird die COPD weltweit die dritthäufigste Todesursache sein [Murray *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 1998]. Verantwortlich hierfür sind unter anderem die begrenzten Therapieoptionen. Während die Gabe von Steroidhormonen für viele Jahre einen wichtigen Therapiebaustein darstellte, hat das zunehmende Auftreten der Steroidresistenz ihre Bedeutung in Frage gestellt. Auch bei der Behandlung des Akuten Lungenversagens (ARDS) wird der Einsatz von Steroidhormonen kontrovers diskutiert. Vorrangiges Ziel der Steroidhormontherapie ist eine Reduktion der Entzündung sowie die damit einhergehende Verbesserung der Symptome. Die Expression von Entzündungsmediatoren spielt bei beiden Erkrankungen eine wichtige Rolle. Infolge einer Stresssituation (Noxen, Trauma, Zytokine) kommt es über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer gesteigerten Acetylierung spezifischer Lysinreste an Histonproteinen. Die damit einhergehende Änderung des Ladungszustandes hat eine Auflockerung der Chromatinstruktur zur Folge, welche die Interaktion zwischen Transkriptionseinheiten und DNA ermöglicht. Die Antwort auf einen Entzündungsreiz liegt in der gesteigerten Expression und Produktion von Zytokinen. Steroidhormone entfalten ihre anti-inflammatorische Wirkung über eine Aktivierung der Histondeacetylase2 (HDAC2) und führen somit zu einer Reduktion der Genexpression. Als mögliche Ursache für das Auftreten der Steroidresistenz wird Inaktivierung der HDAC2 durch oxidativen Stress angesehen. Darunter versteht man einen Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bzw. das Fehlen körpereigener anti-oxidativer Mechanismen. Oxidativer Stress kann demnach sowohl endogener, als auch exogener (Zigarettenrauch, Entzündung, Sauerstoff) Natur sein. Unter Berücksichtigung dieser Vorkenntnisse wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Pro-inflammatorische Stimuli (LPS, alveoläre Überdehnung, IL-1 β) führen zu einer vermehrten Histonacetylierung.
2. Der anti-inflammatorische Effekt von Dexamethason ist abhängig von der Aktivität der HDAC2.

3. Oxidativer Stress (TSA, FiO₂ 1,0) hebt durch die Inhibition der HDAC2 den Steroidhormoneffekt auf.

Zur Überprüfung der Hypothesen wurde das Modell der Isoliert perfundierten und ventilerten Ratten- und Mauslunge genutzt. Des Weiteren wurden die im Tiermodell gewonnenen Ergebnisse am Modell der humanen Monozyten nachvollzogen. Anhand der Ergebnisse wurden zwei wesentliche Aussagen deutlich:

1. Dexamethason entfaltet seine anti-inflammatorische Wirkung unabhängig von der HDAC-Aktivität.
2. Sauerstoff ist in der Lage den anti-inflammatorischen Steroideffekt aufzuheben.

Im Modell der humanen Monozyten führte die Stimulation mit IL-1 β zum Anstieg der Zytokinkonzentrationen sowie zu einer vermehrten Acetylierung an H4K12. Die Gabe von Dexamethason nahm auf die Histonacetylierung keinen Einfluss, führte jedoch zur Reduktion der Entzündungsmediatoren. TSA hatte keinen Einfluss. In beiden Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass weder LPS, die alveoläre Überdehnung noch Dexamethason einen starken Einfluss auf die Histonacetylierung haben. Alle Stimuli führten aber zu einem Anstieg der Zytokinkonzentrationen, die durch Dexamethason wiederum gehemmt wurden. Die Beatmung mit hochkonzentriertem Sauerstoff führte trotz Steroidgabe zu einem erneuten Anstieg der Zytokinkonzentrationen. Demnach ist Sauerstoff in der Lage den Steroideffekt aufzuheben und eine Steroidresistenz herbeizuführen. Dieses Ergebnis ist sowohl im Hinblick auf die Behandlung des ARDS (Beatmungsregime), als auch auf die Sauerstofflangzeittherapie bei der COPD interessant. Die Hypothese, dass oxidativer Stress eine Steroidresistenz bedingt, konnten wir aufgrund der fehlenden Korrelation zwischen Histonacetylierung und Zytokinkonzentration nicht bestätigen. Das könnte bedeuten, dass sowohl die Wirkung von Steroidhormonen als auch die Ursache für die Steroidresistenz nicht an die HDAC2-Aktivität gekoppelt ist. Um die Ursache des fehlenden Ansprechens auf Steroidhormone zu ermitteln, werden weitere Studien folgen müssen.

6. Literaturverzeichnis

- Adcock IM: Histone deacetylase inhibitors as novel anti-inflammatory agents. *Curr Opin Investig Drugs* **7**, 966-973. (2006)
- Adcock IM und Barnes PJ: Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest* **134**, 394-401. (2008a)
- Adcock IM, Ford PA, Bhavsar P, Ahmad T, Chung KF: Steroid resistance in asthma: mechanisms and treatment options. *Curr Allergy Asthma Rep* **8**, 171-178. (2008b)
- Adcock IM, Ito K, Barnes PJ: Histone deacetylation: an important mechanism in inflammatory lung diseases. *Copd* **2**, 445-455. (2005)
- Adcock IM, Lane SJ, Brown CR, Lee TH, Barnes PJ: Abnormal glucocorticoid receptor-activator protein 1 interaction in steroid-resistant asthma. *J Exp Med* **182**, 1951-1958. (1995)
- Allfrey VG: Changes in chromosomal proteins at times of gene activation. *Fed.Proc.* **29**, 1447-1460. (1970)
- Allfrey VG: Post-synthetic modification of histone structure: a mechanism for the control of chromosome structure by the modulation of histone-DNA-interactions. *Chromatin and Chromatin Structure*, 167-191. (1977)
- Allfrey VG, Faulkner RM, Mirsky AE: Acetylation and Methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **51**, 786-794. (1964)
- Almawi WY, Lipman ML, Stevens AC, Zanker B, Hadro ET, Strom TB: Abrogation of glucocorticoid-mediated inhibition of T cell proliferation by the synergistic action of IL-1, IL-6, and IFN-gamma. *J Immunol* **146**, 3523-3527. (1991)
- Ashburner BP, Westerheide SD, Baldwin AS, Jr.: The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol* **21**, 7065-7077. (2001)
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M: Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* **270**, 286-290. (1995)
- Barnes PJ: Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* **27**, 413-426. (2006a)
- Barnes PJ: How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* **148**, 245-254. (2006b)
- Barnes PJ und Karin M: Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* **336**, 1066-1071. (1997)

- Beato M, Truss M, Chavez S: Control of transcription by steroid hormones. *Ann N Y Acad Sci* **784**, 93-123. (1996)
- Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R: The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* **149**, 818-824. (1994)
- Bhavsar P, Ahmad T, Adcock IM: The role of histone deacetylases in asthma and allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* **121**, 580-584. (2008)
- Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**, 77-89. (1968)
- Buchczyk DP, Grune T, Sies H, Klotz LO: Modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by increasing concentrations of peroxynitrite: early recognition by 20S proteasome. *Biol Chem* **384**, 237-241. (2003)
- Chen L, Fischle W, Verdin E, Greene W: Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation. *Science* **293**, 1653-1657. (2001)
- Choi JH, Oh SW, Kang MS, Kwon HJ, Oh GT, Kim DY: Trichostatin A attenuates airway inflammation in mouse asthma model. *Clin Exp Allergy* **35**, 89-96. (2005)
- Chrousos GP, Detera-Wadleigh SD, Karl M: Syndromes of glucocorticoid resistance. *Ann Intern Med* **119**, 1113-1124. (1993)
- Church DF und Pryor WA: Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* **64**, 111-126. (1985)
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-749. (2003)
- Deutsche Atemwegsliga e.V: <http://www.atemwegsliga.de> (Zugriff 30.06.2009)
- Deutsche Hochdruckliga e.V.: <http://www.paritaet.org/RR-Liga> (Zugriff 30.06.2009)
- Dombrowsky H und Uhlig S: Steroids and histone deacetylase in ventilation-induced gene transcription. *Eur Respir J* **30**, 1-3. (2007)
- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP: Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188-193. (1999)
- Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T: CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 2927-2932. (1997)

- Gilmour PS, Rahman I, Donaldson K, MacNee W: Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, L533-540. (2003)
- Grage-Griebenow E, Lorenzen D, Fetting R, Flad HD, Ernst M: Phenotypical and functional characterization of Fc gamma receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *Eur J Immunol* **23**, 3126-3135. (1993)
- Griffith DE, Garcia JG, James HL, Callahan KS, Iriana S, Holiday D: Hyperoxic exposure in humans. Effects of 50 percent oxygen on alveolar macrophage leukotriene B4 synthesis. *Chest* **101**, 392-397. (1992)
- Held HD, Boettcher S, Hamann L, Uhlig S: Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 711-716. (2001)
- Hench PS: The effect of a hormone of the adrenal cortex, 17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone (compound E), on the acute phase of rheumatic fever. *Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic* **24**, 277-297. (1949)
- Hugo Sachs Elektronik , Bedienungsanleitung zur Apparatur: Isolierte Perfundierte Lunge Größe 1 (IL1) Typ 893, Version 1.1, Druckdatum 07.08.1997, 15-18, March-Hugstetten, Deutschland, 1997
- Ito K und Adcock IM: Histone acetylation and histone deacetylation. *Mol Biotechnol* **20**, 99-106. (2002)
- Ito K, Barnes PJ, Adcock IM: Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* **20**, 6891-6903. (2000)
- Ito K, Hanazawa T, Tomita K, Barnes PJ, Adcock IM: Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 240-245. (2004)
- Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, Barnes PJ: Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **352**, 1967-1976. (2005)
- Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM: Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *Faseb J* **15**, 1110-1112. (2001)
- Iwata K, Tomita K, Sano H, Fujii Y, Yamasaki A, Shimizu E: Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, down-regulates interleukin-12 transcription in SV-40-transformed lung epithelial cells. *Cell Immunol* **218**, 26-33. (2002)

- Kam JC, Szeffler SJ, Surs W, Sher ER, Leung DY: Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J Immunol* **151**, 3460-3466. (1993)
- Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ: Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **153**, 530-534. (1996)
- Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, Barnes PJ: Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 542-548. (1997)
- Keslacy S, Tliba O, Baidouri H, Amrani Y: Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-inducible inflammatory genes by interferon-gamma is associated with altered nuclear factor-kappaB transactivation and enhanced histone deacetylase activity. *Mol Pharmacol* **71**, 609-618. (2007)
- Königshoff M und Brandenburger T, *Kurzlehrbuch der Biochemie*, 351-352, Thieme Verlag, Stuttgart, 2004
- Kornberg RD: Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871. (1974)
- Kornberg RD und Thomas JO: Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* **184**, 865-868. (1974)
- Leoni F, Zaliani A, Bertolini G, Porro G, Pagani P, Pozzi P, Dona G, Fossati G, Sozzani S, Azam T, Bufler P, Fantuzzi G, Goncharov I, Kim SH, Pomerantz BJ, Reznikov LL, Siegmund B, Dinarello CA, Mascagni P: The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2995-3000. (2002)
- Lin HS, Hu CY, Chan HY, Liew YY, Huang HP, Lepescheux L, Bastianelli E, Baron R, Rawadi G, Clement-Lacroix P: Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. *Br J Pharmacol* **150**, 862-872. (2007)
- Löffler G und Petrides P, *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage, 259, Abb.: 10.30, Springer Verlag, Berlin, 1998
- Lopez AD und Murray CC: The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* **4**, 1241-1243. (1998)
- Lu NZ und Cidlowski JA: The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci* **1024**, 102-123. (2004)
- Meduri GU: An historical review of glucocorticoid treatment in sepsis. *Disease pathophysiology and the design of treatment investigation. Sepsis* **3**, 21-28. (1999)

- Meduri GU, Golden E, Freire AX, Taylor E, Zaman M, Carson SJ, Gibson M, Umberger R: Methylprednisolone infusion in early severe ARDS: results of a randomized controlled trial. *Chest* **131**, 954-963. (2007)
- Meduri GU, Tolley EA, Chrousos GP, Stentz F: Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome: evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 983-991. (2002)
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ: Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* **5**, 25-44. (1984)
- Munck A und Naray-Fejes-Toth A: Glucocorticoids and stress: permissive and suppressive actions. *Ann N Y Acad Sci* **746**, 115-130; discussion 131-113. (1994)
- Murray CJ und Lopez AD: Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* **274**, 740-743. (1996)
- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y: The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959. (1996)
- Pelosi P und Rocco PRM: Glucocorticoid Treatment in Acute Respiratory Distress Syndrome: Friend or Foe?. In: *Intensive Care Medicine: Annual Update 2008*. 214-223, Springer Verlag, 2008
- Pujols L, Mullol J, Roca-Ferrer J, Torrego A, Xaubet A, Cidlowski JA, Picado C: Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1324-1331. (2002)
- Rahman I: Oxidative Stress and TNF- α induce histone acetylation and NF-KB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation. *Mol Cell Biochem* **234-235**, 239-248. (2002)
- Repine JE, Bast A, Lankhorst I: Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 341-357. (1997)
- Roissant R, Werner C, Zwißler B, *Die Anästhesiologie*, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage, 5, Springer Verlag, Heidelberg, 2008
- Roth SY, Denu JM, Allis CD: Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**, 81-120. (2001)
- Schmidt P, Youhnovski N, Daiber A, Balan A, Arsic M, Bachschmid M, Przybylski M, Ullrich V: Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *J Biol Chem* **278**, 12813-12819. (2003)

- Schrump DS und Nguyen DM: Targeting the epigenome for the treatment of thoracic malignancies. *Thorac Surg Clin* **16**, 367-377, vi. (2006)
- Schwartz HJ, Lowell, F.C. and J.C. Melby: Steroid resistance in bronchial asthma. *Ann Intern Med* **69**, 493-499. (1968)
- Shim J und Karin M: The control of mRNA stability in response to extracellular stimuli. *Mol Cells* **14**, 323-331. (2002)
- Spahn JD, Szeffler SJ, Surs W, Doherty DE, Nimmagadda SR, Leung DY: A novel action of IL-13: induction of diminished monocyte glucocorticoid receptor-binding affinity. *J Immunol* **157**, 2654-2659. (1996)
- Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB, Hough CL, Lankester PN, Hyzy R, Thompson BT, Ancukiewicz M: Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **354**, 1671-1684. (2006)
- Stuber F, Wrigge H, Schroeder S, Wetegrove S, Zinserling J, Hoeft A, Putensen C: Kinetic and reversibility of mechanical ventilation-associated pulmonary and systemic inflammatory response in patients with acute lung injury. *Intensive Care Med* **28**, 834-841. (2002)
- The R project for statistical computing: <http://www.r-project.org> (Zugriff und Download 01.06.2007).
- Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K: A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot (Tokyo)* **29**, 1-6. (1976)
- Uhlig S: Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: stretching it too far? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**, L892-896. (2002)
- Uhlig S, Nusing R, von Bethmann A, Featherstone RL, Klein T, Brasch F, Müller KM, Ullrich V, Wendel A: Cyclooxygenase-2-dependent bronchoconstriction in perfused rat lungs exposed to endotoxin. *Mol Med* **2**, 373-383. (1996)
- Van Lint C, Emiliani S, Verdin E: The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* **5**, 245-253. (1996)
- Vogelmeier C, Buhl R, Criege CP, Gillissen A, Kardos P, Kohler D, Magnussen H, Morr H, Nowak D, Pfeiffer-Kascha D, Petro W, Rabe K, Schultz K, Sitter H, Teschler H, Welte T, Wettengel R, Worth H: [Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]. *Pneumologie* **61**, e1-40. (2007)
- von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R, Vogt K, Volk HD, Müller KM, Wendel A, Uhlig S: Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 263-272. (1998)

- Wangh L: Separations and analysis of histone subfractions differing in their degree of acetylation: some correlations with genetic activity in development. Arch Biochem Biophys **150**, 44-56. (1972)
- WHO-Report 2007: <http://www.who.int> (Zugriff 30.06.2009)
- Wright JG und Christman JW: The role of nuclear factor kappa B in the pathogenesis of pulmonary diseases: implications for therapy. Am J Respir Med **2**, 211-219. (2003)
- Yoshida M, Nomura S, Beppu T: Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. Cancer Res **47**, 3688-3691. (1987)
- Zhang K, Williams KE, Huang L, Yau P, Siino JS, Bradbury EM, Jones PR, Minch MJ, Burlingame AL: Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. Mol Cell Proteomics **1**, 500-508. (2002)

7. Anhang

7.1 Symbole, Einheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
d	Dezi, 10 ⁻²
d	Tag
f	Femto, 10 ⁻¹⁵
g	Gramm
h	Stunde
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
km	Kilometer
l	Liter
m	Milli
m	Meter
M	Molar
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	Nano
osm	Osmolar
p	Piko, 10 ⁻¹²
s	Sekunde
t	Zeit
V	Volt
w/v	weight per volume
W	Watt
μ	Mikro, 10 ⁻⁶
%	Prozent

7.2 Elutriationsprotokoll

Geschwindigkeit der Pumpe [U/min]	Durchflussvolumen [ml/min]	fraktioniertes Eluat
31	50	Einladen der Zellen
34	50	Spülschritt
36	50	Spülschritt
40	200	kleine Lymphozyten
41	50	Spülschritt (Lymphozyten)
42	50	Spülschritt (Lymphozyten)
43	50	Spülschritt (Lymphozyten)
44	50	Spülschritt (Lymphozyten)
45	200	große Lymphozyten
46	200	Spülschritt
47	200	Spülschritt
48	200	Spülschritt
49	50	Beginn Monozyten
50-Zentrifugenstopp		Monozyten

Tabelle 4: Elutriation von Monozyten

Die mit Hilfe von Zentrifugation gewonnenen PBMCs (periphere blood mononuclear cells) wurden durch Elutriation in Lymphozyten und Monozyten aufgetrennt. U/min, Umdrehungen pro Minuten, ml/min, Milliliter pro Minute

7.3 Harnstoffgel

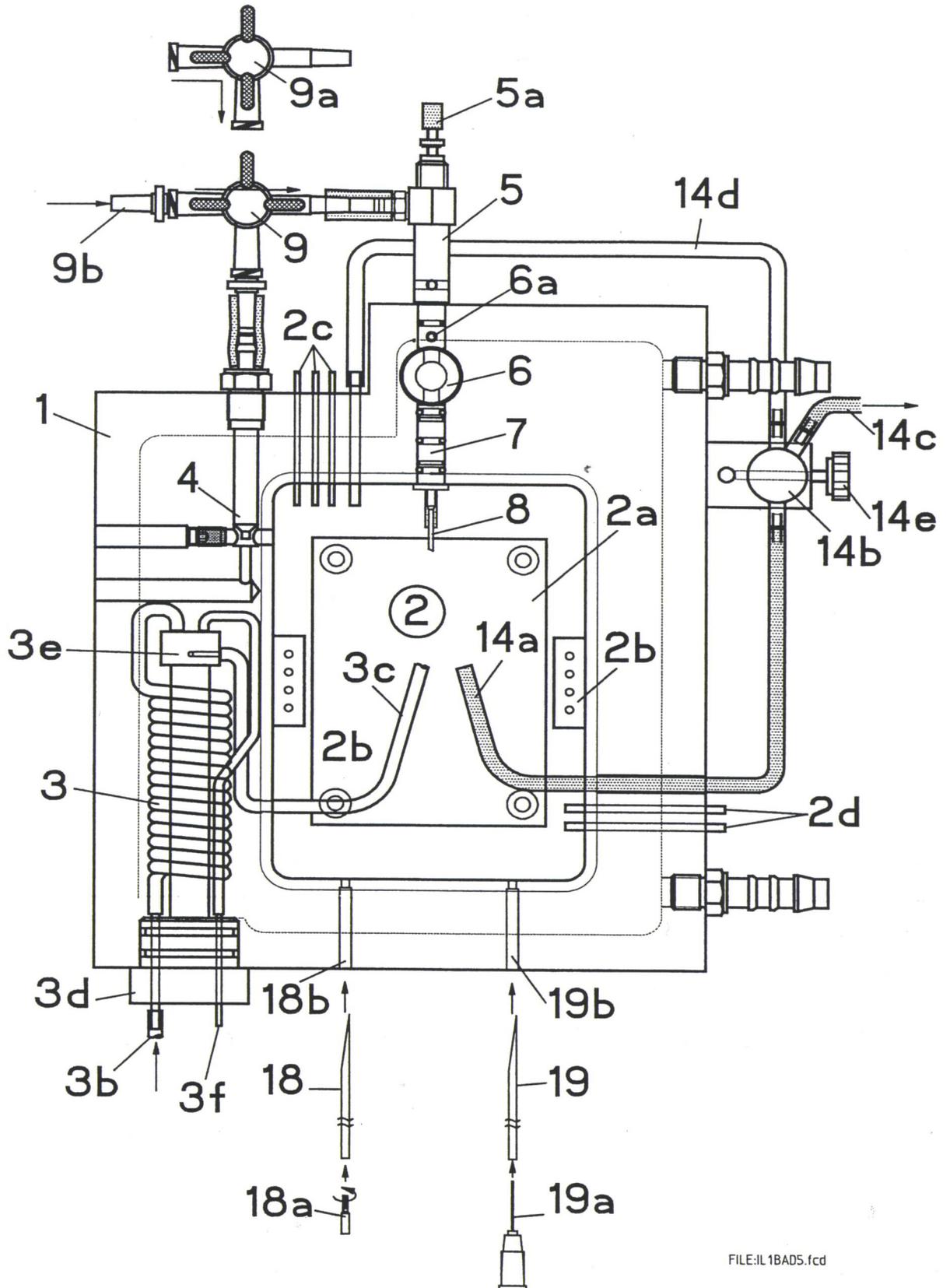
	Trenngel 12% (30ml)	Sammelgel 4% (15ml)
Harnstoff	7,2g	7,2g
30% PAA/Bis-AA	6ml (37,5:1)	1,95ml (19:1)
Eisessig (100%)	900µl	900µl
NH ₄ OH (25%)	70µl	210µl
Triton X-100 (25%)	1ml	/
MQ	750µl	5,9ml
TEMED	75µl	150µl
Riboflavin 0,004% (w/v)	1ml	0,7ml

Tabelle 5: Zusammensetzung der Harnstoffgele

Mit Hilfe von Harnstoffgelen wurden die extrahierten Histone nach Größe, Ladung und hydrophoben Eigenschaften aufgetrennt. Die Zusammensetzung des Trenn- bzw. Sammelgels sind der obigen Tabelle zu entnehmen. Angegeben sind Menge oder Volumina der verwendeten Chemikalien in Gramm (g), Milliliter (ml) und Mikroliter (µl). %, Prozent, w/v, weight/volume.

7.4 Isolierte, Perfundierte Lunge Größe 1 Typ 893

[Hugo Sachs Elektronik, 1997]



FILE:IL1BA05.fcd

7.4.1 Legende zu 7.4

- 1 Grundkörper der Lungenkammer aus Plexiglas
- 2 Kammerinnenraum
- 2a Korkeinlage T20124, Abmessungen 80x60x8mm
- 2b Befestigungspunkte für Miniatur-Kugelgelenke zum Halten der Pulmonalarterienkanüle (11) und der venösen Abflusskanüle (14)
- 2c Durchführungsröhrchen
- 2d Durchführungsröhrchen
- 3 Wärmeaustauscher
- 3a Perfusatschlauch inklusive Pumpschlauch
- 3b Einlassstutzen des Wärmeaustauschers
- 3c Perfusat-Zuleitung
- 3d Plexiglaskörper des Wärmeaustauschers
- 3e Blasenfalle
- 3f Anschluss zum Entlüften der Blasenfalle (3e)
- 4 Venturidüse, wandelt den Überdruck-Luftstrom des VCM (20) in Unterdruck um
- 5 Ventilationskopf für die Überdruckbeatmung
- 5a Nadelventil zum Justieren des Trachealdrucks
- 6 Lufterwärmer bzw. Luftbefeuchter
- 6a Einspeisung der Beatmungsgase
- 7 Pneumotachometer (PTM) zur Messung des Luftflusses
- 8 Trachealkanüle
- 9 Dreivehgehahn zur Umstellung von Überdruck- auf Unterdruckbeatmung
- 10 Differenz-Druckaufnehmer
- 11 Pulmonalarterienkanüle mit Miniatur-Kugelgelenkhalter
- 12 Druckaufnehmer zum Erfassen des Kammerinnendrucks
- 13 Blutdruckaufnehmer zum Erfassen des Perfusionsdrucks der Pulmonalarterienkanüle(11)
- 14 Venöse Abflusskanüle mit Miniaturgelenkhalter
- 15 Rollpumpe
- 16 Vorratsgefäß für das Perfusat (Verbrauch 60ml/h)
- 17 Sammelgefäß für das verbrauchte Perfusat
- 18 Schlauchkatheter für die Substanzgabe als Bolus
- 19 Probenentnahmeschlauch
- 20 Steuereinschub HSE PLUGSYS „Ventilation Control Module (VCM) Typ 681, liefert die exakt dosierte Luft, die zur Ventilation der Lunge in der Kammer benötigt wird
- 21 Druckaufnehmer zur Erfassung des Drucks in der Trachealkanüle

7.5 Einverständniserklärung der Probanden

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

Klinik für Anästhesiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Peter Schmucker

Campus Lübeck

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein
Ratzeburger Allee 160 D-23538 Lübeck

HDAAV- Einverständniserklärung

(Histondeacetylase Activity and Ventilation)

Auswirkungen erhöhter Sauerstoffkonzentrationen während der Narkosebeatmung auf die Genregulation der
Histonacetylierung

Name:

Geburtsdatum:

Ich bin durch die unten genannte Ärztin / den unten genannten Arzt über Bedeutung und Ziel der oben genannten Untersuchung sowie eventuelle Nebenwirkungen schriftlich und in einem Gespräch ausführlich unterrichtet worden. Ich habe keine weiteren Fragen.

Der Teilnahme an der Untersuchung stimme ich zu und weiß, dass diese Teilnahme vollkommen freiwillig geschieht.

Ich kann meine Teilnahme an dieser Untersuchung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen, ohne dass das Verhältnis zwischen mir und der Ärztin / dem Arzt in irgendeiner Weise beeinflusst wird oder mir Nachteile entstehen.

Ich weiß, dass die im Rahmen dieser Untersuchung gewonnenen Daten dem Datenschutzgesetz unterliegen, bin aber damit einverstanden, dass die Daten in anonymisierter Form ausgewertet werden.

Lübeck, den

Unterschrift Patient/in

Unterschrift Ärztin/Arzt

Klinik für Anästhesiologie
Universitätsklinik Lübeck

7.6 Erfassungsbogen Probanden

HDAC-project

–Histone deacetylation during ventilation with high fraction of inspired Oxygen

Klinische Untersuchung zu Auswirkungen von erhöhten Sauerstoffkonzentrationen während der Narkosebeatmung auf die Genregulation der Histonacetylierung.

Erfassungsbogen Probanden

<i>Datum:</i>	
---------------	--

<i>Probandennummer:</i>	
-------------------------	--

<i>Geburtsdatum</i>	
Geschlecht	
Größe	
Gewicht	
ASA	

Lungenfunktion und BGA	
VC	
FEV1	
pH	
pCO ₂	
Bicarbonat (st)	
BE	
pO ₂	
SaO ₂	
Hb	

Diff. BB	

Kreislaufparameter	
RR sys	
RR diast	
RR med	
Puls	

Uhrzeit	Besonderheiten

7.7 Laborwerte

In Anlehnung an die Richtwerte des Zentralen Hämatologie- und Gerinnungslabors der Medizinischen Klinik I, Prof. Dr. H. Lehnert, UKSH Campus Lübeck

7.7.1 Blutbild/ Differentialblutbild

Leukozyten	4000-9000/ μ l	
Erythrozyten	w 4,2 – 5,4/ml	m 4,5 – 6,3/ml
Hämoglobin	w 12,0 – 16,0 g/dl	m 14,0 – 18,0 g/dl
Hämatokrit	0,38 – 0,52%	
MCV	84 – 93 fl	
MCH	27 – 33 pg	
MCHC	320 – 360 g/l	
Thrombozyten	150 – 400/nl	
MPV	5 – 9 fl	
Stabkernige	130 – 320/ μ l	
Segmentkernigel	2200 – 6300/ μ l	
Lymphozyten	1320 – 3600/ μ l	
Monozyten	40 – 630/ μ l	
Eosinophile	50 - 360/ μ l	
Lymph. Reaktionsform	0/ μ l	

8. Danksagung

An der Entstehung dieser Arbeit waren viele Menschen beteiligt, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Zuallererst möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre langjährige Unterstützung bedanken. Sie haben den Grundstein gelegt, Rückhalt geboten und mir stets das Gefühl gegeben das Richtige zu tun. Meinem Freund Kai Tuschling danke ich besonders für seine bemerkenswerte Geduld und Rücksicht. Er fand stets die richtigen Worte Misserfolge abzuhaken, neuen Mut zu fassen und bei allem Stress das Lachen nicht zu vergessen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Torsten Meier für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung während der Arbeit sowie die vielen konstruktiven und motivierenden Gespräche.

Prof. Dr. Stefan Uhlig danke ich für die Bereitstellung des Laborplatzes, seine Unterstützung und Engagement bei der Fertigstellung dieser Arbeit sowie sein allzeit offenes Ohr für meine Fragen.

Frau Dr. Heike Dombrowsky möchte ich für eine hervorragende, monatelange Betreuung innerhalb und außerhalb des Labors danken. Vielen Dank für die Geduld und für alles, was ich durch sie gelernt habe.

Dörte Karp, Frank Seel und Anke Kowallik gilt mein Dank für die Durchführung der Tierversuche bzw. der ELISA. Renate Bergmann möchte ich für die Unterstützung bei der Monozytenelutriation danken. Dank ihrer Erfahrung war es überhaupt erst möglich, die Studie an den humanen Monozyten zu realisieren.

Allen Mitarbeitern des Forschungszentrum Borstel danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

9. Curriculum vitae

Maren Kunze

geboren am 01.04.1982 in Dresden

ledig



Schulbildung

1988 – 1994	1.Grundschule Senftenberg
1994 – 2001	Gymnasium Senftenberg, Abitur (1,1)

Akademische Laufbahn

2001 bis 2008	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
09/2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,3)
05/2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,5)
seit 08/2008	Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie, Klinikum Neustadt, Schön Kliniken

Promotion

10/2004	Beginn der Promotion
07/2005-09/2007	Vorversuche im Forschungszentrum Borstel, Abteilung für Lungenpharmakologie, Prof. Dr. Stefan Uhlig
11/2005-07/2006	Humane Monozytenstudie
08/2006-02/2007	Auswertung der Tierversuche (IPL Maus, IPL Ratte)
bis 06/2009	Fertigstellung der Arbeit

Kongress

10/2007	Abstract und Vortrag ESICM Kongress, Berlin „Can ventilation with oxygen induce steroid resistance?“
---------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------

10. Publikation

im Review:

Dombrowsky H, Barrenschee M, Kunze M, Uhlig S: Trichostatin causes similar patterns of pulmonary gene expression in response to LPS and stretch in rats and mice. *Pulm Pharmacol* (2009)