Einfluss von Resolvin E1 auf die pulmonale Inflammation

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Hache, Karl Helmer aus Bautzen Gießen, 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Hecker Gutachter: Prof. Dr. Weißmann

Tag der Disputation: 17.02.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Ei	nleitung	1
1.1.	Pneumonie	1
1.1.1.	Definition, Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2.	Klinik und Diagnostik	2
1.1.3.	Therapie	3
1.1.4.	Komplikationen	5
1.2.	Sepsis – eine gefährliche Komplikation der Pneumonie	6
1.3.	Mitochondriale Dysfunktion während der Inflammation	10
1.4.	Auflösen der Entzündung	13
1.5.	Resolvin E1	16
1.6.	Zielsetzung dieser Arbeit	18
2. Ma	aterial und Methoden	19
2.1.	Material	19
2.1.1.	Geräte	19
2.1.2.	Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	21
2.1.3.	Verwendete Kits	25
2.1.4.	Verwendete Primer	25
2.2.	Methoden	26
2.2.1.	Zellkultur	26
2.2.1.1.	. Allgemein	26
2.2.1.2.	. Zellversuche mit Resolvin E1	26
2.2.1.3	. Zellversuche mit Mdivi und Dynasore	
2.2.1.4	Zellversuche zu BLT-1	29
2.2.2.	Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)	
2.2.3.	Zellstress- und Apoptose-Arrays	
2.2.4.	Messung der Zellatmung	31
2.2.4.1.	. Messung der Proben mittels High-Resolution-Respirometry	31
2.2.4.2.	. Oligomycin	32
2.2.4.3.	. FCCP	32
2.2.4.4.	. Antimycin A	33
2.2.5.	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	33
2.2.6.	Western Blot	37
2.2.7.	Statistik	42
3. Er	gebnisse	43

3.1.	Auswirkung von RvE1 auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine	43
3.2.	Einfluss von RvE1 auf die Expression von Zellstress- und Apoptose- assoziierten Proteinen	44
3.3.	Analyse von RvE1-Rezeptoren	44
3.4.	Veränderung der Zellatmung unter dem Einfluss von Resolvin E1	47
3.5.	Bestimmung der Kopienzahl mitochondrialer DNA	47
3.6.	Veränderungen in der Expression von "fission and fusion"-Genen und - Proteinen	48
3.7.	Einfluss von mitochondrial fission and fusion auf die Inflammation	50
3.8.	Veränderung der Zellatmung unter dem Einfluss von Mdivi-1 und Dynasore	51
4.	Diskussion	54
4.1.	Auswirkungen von Inflammation auf die Lungenzelle	54
4.2.	Einfluss von RvE1 auf die pulmonale Entzündungsreaktion	55
4.3.	Veränderungen in der Zellatmung	57
4.4.	Mitochondriale Dysfunktion durch Veränderung der mitochondrialen Morphologie	58
4.5.	Möglicher Therapeutischer Ansatz durch Mdivi-1 und Dynasore	60
5.	Zusammenfassung	63
6.	Summary	64
7.	Abkürzungsverzeichnis	65
8.	Abbildungsverzeichnis	69
9.	Tabellenverzeichnis	70
10.	Literaturverzeichnis/Quellenangaben	71
11.	Erklärung zur Dissertation	85
12.	Danksagung	86

1. Einleitung

1.1. Pneumonie

1.1.1. Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Die Pneumonie gehört weltweit zu den am häufigsten tödlich verlaufende Infektionskrankheiten [78]. Die Pneumonie ist definiert als akute oder chronische Infektionserkrankung des Lungengewebes, welche durch Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen oder Parasiten verursacht wird und ist als Infektion der unteren Atemwege klassifiziert [7]. Infektionen der unteren Atemwege stehen nach Myokardinfarkten, Schlaganfällen und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung an vierter Stelle der zehn häufigsten Todesursachen weltweit, in Entwicklungsländern sind sie mit Abstand die häufigste Todesursache [2, 148].

Pneumonien werden klinisch eingeteilt in ambulant erworben (*community-acquired pneumonia*; CAP) und nosokomial, also im Krankenhaus erworben (*hospital-acquired pneumonia*; HAP) [31, 42]. Dabei sind nosokomiale Pneumonien Pneumonien die frühestens 48 Stunden nach Hospitalisierung oder in den ersten Wochen nach einem Krankenhausaufenthalt auftreten [31]. Als Sonderform der CAP ist die Pneumonie bei Heimbewohnern oder in Pflegeeinrichtungen Lebenden abzugrenzen (IAP, *institution-acquired pneumonia*).

Weitere Einteilungsmöglichkeiten sind nach Verlauf (typisch, untypisch), nach Verteilungsmuster (alveolär, interstitiell), sowie nach Begleitumständen (primär, sekundär) möglich [7].

Anhand von Auswertungen des Institutes für Qualität und Patientensicherheit wird angenommen, dass jährlich 400.000 – 600.000 Menschen in Deutschland an der Pneumonie erkranken, wovon zirka 200.000 Patienten stationär behandelt werden müssen [41]. Hierbei sind mehr als 65 % älter als 70 Jahre [103].

Die häufigsten Erreger der CAP sind vor allem Streptococcus pneumoniae, gefolgt von Mycoplasma pneumoniae, Haemophilus influenzae und Viren. Die häufigsten Erreger der HAP stellen aerobe und fakultativ anaerobe Gram-negative Stäbchenbakterien, wie Pseudomonas aeruginosa und Enterobacteriaceae (Escherichia coli, Klebsiella spp. und Enterobacter spp.), dar [31, 42].

1.1.2. Klinik und Diagnostik

Die typische Pneumonie beginnt plötzlich mit Fieber, welches binnen weniger Stunden auf 40 °C, begleitet von Schüttelfrost, ansteigt. Hinzu kommen Dyspnoe, Husten und (eitriger) Auswurf, sowie (Glieder-)Schmerzen. Auskultatorisch machen sich ein feines Knistern, feinblasige Rasselgeräusche sowie Bronchialatmen bemerkbar [147]. Eine Pneumonie kann sich jedoch auch durch schleichenden Beginn, Husten, geringere Atemnot und geringes Fieber äußern [7].

Zur Einschätzung des Risikos eines schweren Verlaufes einer Pneumonie dient der CRB-65-Score. Die Kriterien des CRB 65 Score sind: (neuaufgetretene) Bewusstseinstrübung (*confusion*), Atemfrequenz $\geq 30/\text{min}$ (*respiratory rate*), diastolischer Blutdruck ≤ 60 mmHg oder systolischer Blutdruck < 90mmHg (*blood pressure*) und ein Alter ≥ 65 Jahre [84, 95]. Für jedes erfüllte Kriterium wird ein Punkt verteilt und nach der Summe der Punkte ergeben sich folgende Risikogruppen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Risikogruppen nach CRB 65 Score nach [66]

Risikogruppe	Punktzahl
Niedriges Risiko	0
Mittleres Risiko	1-2
Hohes Risiko	3-4

Je nach Studie wird das Risiko für einen letalen Verlauf folgendermaßen angegeben: 0-3 % für Gruppe 1, 6-13 % für Gruppe 2 und 23-35 % für Gruppe 3 [41, 42, 66].

Für den Fall einer schwer verlaufenden Pneumonie sind die beiden wichtigsten Schritte das frühestmögliche Erkennen eines solchen Falles und die sofortige antibiotische Behandlung (zusätzlich zu allen weiteren Maßnahmen abhängig von der Schwere des Verlaufes) [31, 42]. Neben der typischen Klinik dient der radiologische Nachweis neuaufgetretener Infiltrate in der Lunge als beweisend. Nicht nur zur weiteren Sicherung der Diagnose, sondern zur Optimierung der Therapie sollte (vor allem bei stationärer Behandlung) zusätzlich der Erreger, mittels Blutkultur und nach Möglichkeit durch Sputumuntersuchungen, nachgewiesen werden [42]. Ebenfalls ist in der aktuellen S3 Leitlinie (2016) der Urin-Antigentest auf Legionellen empfohlen [42].

1.1.3. Therapie

In einer Studie zur Auswertung der CAPNETZ-Stiftung, wie auch in der aktuellen deutschen Leitlinie zur Behandlung der ambulanten Pneumonie wird beschrieben, dass die ersten Tage einer Pneumonie (72 Stunden) die gefährlichsten sind [41, 42]. Daher ist die schnellstmögliche optimale antibiotische Therapie ein zentraler Bestandteil der Therapie. Diese wird initial, bis zum definitiven Erregernachweis, zunächst kalkuliert gestartet. Dabei reicht in der Regel für die ambulante Behandlung ein Aminopenicillin, welches gegebenfalls mit einem Betalaktaminhibitor ergänzt wird, alternativ kann auf ein Fluorchinolon oder Makrolid ausgewichen werden. Bei mittelschweren Fällen werden Aminopenicilline mit Betalaktaminhibitoren oder ein Cephalosporin mit Makroliden kombiniert. In schweren Fällen ist initial Piperacillin plus Tazobactam in Kombination mit einem Makrolid empfohlen. Für nähere Information kann die S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin [42] zu Rate gezogen werden.

Ergänzend zu der antiinfektiven Therapie stehen die stationäre Behandlung (ab CRB-65 Gruppe 2, siehe oben), sowie die intensivmedizinische Betreuung der Patienten mit schwerer Pneumonie (Gruppe 3) im Vordergrund. Bei älteren Menschen mit einer leichten oder mittelschweren Pneumonie ist der CRB-65-Score jedoch nicht immer zuverlässig, daher werden die sogenannten Minorkriterien der ATS/IDSA aus dem Jahr 2007 als bester prädiktiver Faktor empfohlen [42, 82]. Die Kriterien dienen der Abschätzung ob eine intensivmedizinische Therapie notwendig wird, was bei Erfüllen von zwei der in der folgenden Tabelle (Tabelle 2: Modifizierte Minorkriterien zur Beurteilung der Notwedigkeit der Intensivtherapie bei ambulant erworbener Pneumonie [42] Seite 4) dargestellten Kriterien der Fall ist. Gerade diese Patientengruppe leidet zusätzlich unter Vor- und Begleiterkrankungen, welche die Prognose der Pneumonie deutlich verschlechtern [42]. So zeigten die Auswertungen der CAPNETZ-Studie von Pletz et al., dass mehr als 65 % der Patienten über 70 Jahre alt waren und auch die Sterblichkeit der Erkrankung mit dem Alter signifikant zu nahm (< 1,5 % bei den bis 39-Jährigen verglichen mit 19,1 % in der Gruppe der 80–89-jährigen Patienten) [103].

Tabelle 2: Modifizierte Minorkriterien zur Beurteilung der Notwendigkeit der Intensivtherapie bei ambulant erworbener Pneumonie [42]

Minorkriterien		
1) schwere akute respiratorische Insuffizienz		
$(PaO2 \le 55 \text{ mmHg bzw.} \le 7 \text{ kPa bei Raumluft})$		
2) Atemfrequenz \geq 30/Minute		
3) multilobäre Infiltrate in der Röntgenthoraxaufnahme		
4) neu aufgetretene Bewusstseinsstörung		
5) systemische Hypotension mit Notwendigkeit der		
aggressiven Volumentherapie		
6) akutes Nierenversagen (Harnstoff-N \ge 20 mg/dL)		
7) Leukopenie (Leukozyten < 4000 Zellen/mm3)		
8) Thrombozytopenie (Thrombozyten < 100.000 Zellen/mm3)		
9) Hypothermie (Körpertemperatur < 36 °C)		

Der Erfolg der Therapie wird vor allem an der Besserung der klinischen Symptomatik sowie an der Regredienz der inflammatorischen Parameter beurteilt. Diese sogenannten Zeichen klinischer Stabilität sind in Tabelle 3 einzusehen:

Herzfrequenz	\leq 100/min
Atemfrequenz	$\leq 24/\min$
systolischer Blutdruck	\geq 90 mmHg
Körpertemperatur ≤ 37,8 °C	≤ 37,8 °C
gesicherte Nahrungsaufnahme	oral oder sichere Zugänge
Bewusstseinszustand	normal bzw. Wiedererreichen des vorbestehenden
	Zustands
keine Hypoxämie	$pO_2 \ge 60 \text{ mmHg bzw. } SaO_2 \ge 90\% \text{ unter Raumluft}$

Tabelle 3: Die definierten Zeichen der klinischen Stabilität erfolgreicher Pneumonietherapie [42]

Die klinische Stabilität des Patienten sollte im Optimalfall nach 48-72 Stunden erreicht werden, da in diesem Zeitraum das höchste Risiko für eine akute Verschlechterung der Organfunktion besteht [35, 42, 102]. Tritt keine Besserung innerhalb dieses Zeitraumes

ein, sollte über ein mögliches Versagen der Therapie nachgedacht werden [42]. Dabei ist die verzögert ansprechende Pneumonie von der progredienten Pneumonie abzugrenzen: Die verzögert ansprechende Pneumonie ist definiert als Nichterreichen klinischer Stabilität nach 72 Stunden, trotz adäquater Therapie, zeigt jedoch keine Progredienz [42, 66]. Eine progrediente Pneumonie ist definiert als klinische Zustandsverschlechterung mit Entwicklung einer respiratorischen Insuffizienz und/oder einer schweren Sepsis oder eines septischen Schockes trotz empirischer antimikrobieller Therapie. Sie entwickelt sich bei 5-10 % aller hospitalisierten Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie [66] und weist eine bis zu zehnfach erhöhte Letalität auf [78]. Die Ursachen des Therapieversagens sind vielfältig und können infektiöser (zum Beispiel Erregerresistenzen) oder nicht-infektiöser (Komorbidäten, Komplikationen) Genese sein [42, 66]. Die entsprechende Therapie ist ebenso vielfältig und richtet sich nach der Ursache. Allen gemein ist jedoch das intensivmedizinische Management zur Stabilisierung bzw. Sicherstellung der Organfunktion. Die Diagnostik sollte sich bei progredienter Pneumonie vorwiegend auf infektiöse Ursachen konzentrieren und Komplikationen wie Pleuraempyem und Abszessbildung ausschließen. Darüber hinaus gilt es, mögliche extrapulmonale Infektionsfoci aufzuspüren.

1.1.4. Komplikationen

Bei älteren Patienten mit einer hospitalisierungspflichtigen CAP treten vermehrt extrapulmonale Komplikationen auf, insbesondere akute Organdysfunktionen [5, 36, 113]. Bei ungefähr 25 % der Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie finden sich kardiale Rhythmusstörungen, Myokardischämien und/oder die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. In 50 % der Fälle geschieht dies innerhalb der ersten 24 Stunden nach stationärer Aufnahme [29, 42]. Eine Pneumonie ist zudem neben kardiovaskulären Erkrankungen auch ein Risikofaktor für zerebrovaskuläre Ereignisse [42, 79]. Die Letalität der stationär behandelten ambulant erworbenen Pneumonie liegt nach Literaturangaben bei 14 % [41], wobei 10 % der hospitalisierten Patienten intensivmedizisch betreut werden müssen. Für diese Patientengruppe finden sich Angaben zur Letalität von 20-50 % [102, 109]. Die wichtigsten frühen Komplikationen sind die akute respiratorische Insuffizienz und die komorbiditäts- oder sepsisbedingte akute extrapulmonale Organdysfunktion [5, 36, 41, 102, 113].

1.2. Sepsis – eine gefährliche Komplikation der Pneumonie

Die Sepsis wird immer noch als führender Punkt für Morbidität und Mortalität weltweit genannt [124]. Sie wird als physiologische, pathologische und biochemische Abnormalität beschrieben, welche durch Infektionen ausgelöst wird [124].

Die Mortalität der Sepsis liegt bei zirka 20 % [139]. Patienten, welche eine Sepsis überlebt haben, leiden oft unter langfristigen gesundheitlichen Folgen. Dies sind physischen oft auch psychologische Komplikation oder kognitive Beinträchtigungen [124]. Abgesehen von diesen direkten Auswirkungen auf die Gesundheit der Patienten hat diese auch Auswirkungen auf die wirtschaftliche Situation, sowohl des Patienten, als auch des Gesundheitswesens [134]. Diese bedingen ihrerseits wieder gesundheitliche Versorgung und soziale Nachteile, welche wiederum eine wirtschaftliche Belastung darstellen.

Die neuste Definition beschreibt die Sepsis als ein lebensbedrohendes Organversagen, welches durch eine fehlgesteuerte Immunantwort des Wirtes auf eine Infektion ausgelöst wird [21, 124]. Dieselbe Expertengruppe, welche die Definition festlegte, verließ auch die bis dato gültigen SIRS (Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom)-Kriterien zur klinischen Beurteilung auf das Vorliegen einer Sepsis, zu Gunsten der neuen SOFA (sequential organ failure assessment score)- Kriterien [80, 124]. Eine akute Veränderung des SOFA-Score um zwei oder mehr Punkte weist dabei auf eine Organdysfunktion hin, welche das Hauptmerkmal der neuen Sepsisdefinition ist [124]. Die Parameter der SOFA-Kriterien sind folgende: die Atemtätigkeit gemessen am Sauerstoffpartialdruck, das zentrale Nervensystem beurteilbar nach dem Glasgow-Coma-Scale (GCS), die Herzkreislaufaktivität gemessen am mittleren arteriellen Druck, die die Leberfunktion an der Höhe des Bilirubin festgehalten, die Blutgerinnung anhand der Zahl der Thrombozyten und die Nierenfunktion festgestellt am Kreatininwert [124]. Für den klinischen Alltag, insbesondere zur schnellen Risikostratifizierung z.B. in der Notaufnahme, gibt es den qSOFA-Score (q = quick), welcher schneller eruierbar ist und vor allem ohne Labortests auskommt. Die Kriterien hierfür sind Atemfrequenz über 22 Atemzüge pro Minute, ein verändertes Bewusstsein (GCS-Veränderung > 2 Punkte) und ein systolischer Blutdruck unter 100 mmHg. Dabei ist bei einem Patienten, der mindestens zwei der drei Kriterien erfüllt, mit einem schlechten Outcome zu rechnen [124]. Bereits ein mäßiger Grad an Organfunktionsstörungen ist bei Verdacht auf eine Infektion mit einer Mortalität im Krankenhaus von mehr als 10 % verbunden [124].

Pathophysiologisch ist die Sepsis charakterisiert als eine vielfältige Wirtsreaktion auf ein eindringendes, infektiöses Pathogen, welche durch endogene Faktoren (zum Beispiel Geschlecht, genetische Disposition, Alter, Komorbiditäten, Umwelt) signifikant verstärkt werden kann [124].

Durch eine exzessive Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie zum Beispiel dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), wird ein septischer Schock hervorgerufen [34].

Der septische Schock wurde als eine Untergruppe der Sepsis definiert, in der Kreislauf-, Zell- und Stoffwechselanomalien mit einem größeren Risiko der Mortalität verbunden sind als die Sepsis allein [122]. Die klinischen Kriterien, die diese Definition darstellen, sind die Notwendigkeit einer Vasopressortherapie, um einen mittleren arteriellen Druck von 65 mmHg oder mehr aufrechtzuerhalten und ein Serumlaktatspiegel von mehr als 2 mmol/l, der nach einer adäquaten Flüssigkeitstherapie persistiert [122]. Diese besondere Form der Sepsis geht, wie oben bereits erwähnt, mit einer nochmals erhöhten Mortalität gegenüber der Sepsis einher, je nach Literaturwerden Werte bis zu 50 % angegeben [21, 122, 124].

Der häufigste Grund für eine Sepsis, ist eine bakterielle Infektion. Es kommen aber auch Viren oder Pilze als Infektionsursache in Frage. Jede Körperregion kann die Quelle dieses schweren Krankheitsbildes sein. Jedoch spielen sich die meisten Infektionen in unserem respiratorischen Organ ab [1, 21, 93], welches der häufigste Ursprung der Sepsis ist [39].

Dazu im Folgenden ein kurzer Blick in die immunologischen Vorgänge während einer Entzündung in der Lunge:

Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene, die verschiedene Mechanismen von physikalischen Barrieren bis zu zellulären Komponenten umfassen [4]. Dabei wird das Eindringen von Pathogenen in die Lunge als erstes über sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs), welche mikrobielle Bestandteile anhand von spezifischen Mustern (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) oder Zellschaden-assoziierten endogenen Proteinen (DAMPs, *danger associated molecular patterns*) detektieren, erkannt [47]. Die PRRs werden dabei vereinfacht in sekretierte, transmembrane und zytosolische Klassen unterteilt. Im

Alveolarkompartiment erkennen transmembrane PRRs wie zum Beispiel die Familie der Toll-like-Rezeptoren (TLR) konservierte mikrobielle Muster, die auf der Zelloberfläche zugänglich sind, beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien (TLR4), Lipoteichonsäuren von grampositiven Bakterien und bakterielle Lipoproteine (TLR1/TLR2 und TLR2/TLR6), sowie Flagellin (TLR5) [71]. Diese PRRs werden von Makrophagen, dendritischen Zellen und rekrutierten Immunzellen sowie von Epithel- und Endothelzellen exprimiert. Intrazelluläre Signalkaskaden, ausgelöst durch Ligandenbindung von PRRs, rufen die Produktion von inflammatorischen Zytokinen, Interferonen und Chemokinen auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene hervor [99]. Hierunter befinden sich vor allem neutrophile Chemolockstoffe wie CXCL1, CXCL2, Interleukin (IL)-1a und Monozyten-Chemoattraktant-Protein-1 (MCP-1) [15, 16]. Daraus resultiert ein schneller Einstrom von Neutrophilen an den Ort der Infektion. Primäre Funktion dieses Neutrophilen-Einstroms und der alveolären Anreicherung ist die Sekretion anti-bakterieller Substanzen, wie Sauerstoffradikale (ROS), Matrix-Metalloproteasen und Proteasen, sowie die Induktion von Phagozytose, Chemotaxis und eine weitere Steigerung der transephithelialen Neutrophileninvasion [110]. Um das Überleben der normalerweise kurzlebigen Zellen (vorprogrammierter Zelltod um übermäßige Entzündung zu verhindern [90]) zu verlängern, produzieren Makrophagen Wachstumsfaktoren wie den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), den Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) und den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) [132]. Einmal rekrutiert, sind Neutrophile in der Lage, eine Entzündungsreaktion der zweiten Welle zu induzieren: so regulieren sie mitunder über die Freisetzung von Faktoren wie Cathepsin G und Azurocidin die Rekrutierung anderer Immunzellen, insbesondere Monozyten/Makrophagen, welche wiede-

Offensichtlich arbeiten Neutrophile und Makrophagen zusammen, um die Immunantwort gegen Pathogene zu verstärken: Es zeigte sich, dass sich Makrophagen abhängig von ihrer Umgebung und den eingehenden Signalen in Form von Botenstoffen in zwei unterschiedlich, teils gegensätzlich wirkende Subtypen differenzieren können. Den proinflammatorischen M1- und den antiinflammatorischen, oder besser entzündungsregulierenden M2-Typ [58]. M1-Makrophagen produzieren vor allem TNF- α und IL-6, wohingegen M2-Makrophagen den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β und

rum weitere Signalkaskaden in Gang setzen [25].

IL-10 zur Erleichterung der Gewebereparatur produzieren [149]. Der Anfang des Entzündungsgeschehens wird zunächst durch die Neutrophilen des M1-Typs initiert. Im Verlauf können Makrophagen durch membrangebundenes TNF- α den programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt, der Neutrophilen einleiten [6]. Diese werden wiederum von im Gewebe lebenden Makrophagen phagozythiert [104], wobei sie wiederum durch Interaktion mit Neutrophilen in ihrer phagozythotischen Fähigkeit bestärkt werden [112]. Dieser Prozess scheint die Umwandlung zum antiinflammatorischen M2-Typ zu bewirken [127]. Es ist jedoch wichtig, dass diese interzelluläre Beziehung streng reguliert wird, da sie sonst zur unkontrollierten Entzündung, und damit dem Übergang in die Pneumonie oder Sepsis, beitragen kann. Kommt es zu einer Störung dieses feinen Gefüges, können proinflammatorische Mediatoren wie TNF- α , Interleukin 6 und ihre Signaltransduktionen auch zu Zellschäden und Apoptose sowie Autophagie führen [47, 88].

Dadurch werden Zellbestandteile freigesetzt, welche über sogenannte Todesrezeptoren die eine Reihe von Caspasen auslösen, wiederum zu Apoptose weiterer Zellen führen [87]. Apoptose kann aber auch durch Oxidationsmittel oder Membranproteine zerstörter Mitochondrien (Cytochrom C), die in das Zellplasma freigesetzt werden, ausgelöst werden [87].

Diese Entzündungsvorgänge finden in der Lunge sowohl in den Alveolaren als auch im umliegenden Gewebe statt und sind als Konsolidierung bekannt. Die daraus resultierende Okklusion der Alveolarräume stört die normale Gasaustauschfunktion der Lunge, was zu den klinischen Symptomen und Kompliaktionen der Pneumonie und später der Sepsis führt.

1.3. Mitochondriale Dysfunktion während der Inflammation

Wie oben beschrieben, spielen Zell- und Stoffwechselveränderungen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Entzündung und folglich auch der Sepsis.

Als eine der Hauptursachen in der Pathogenese des septischen Organversagens gilt die bereits diskutierte Apoptose von Immun- und Gewebezellen. Allerdings verdichten sich die Hinweise, dass nicht nur der Untergang von Zellen, sondern auch eine Störung der mitochondrialen Funktion und somit der Sauerstoffutilisation, eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Progression des Organversagens, beziehungsweise der Sepsis spielen [86].

Sauerstoff wird für viele Vorgänge in der Zelle benötigt, zum Beispiel ister an der Bildung von Desoxyribonukleotiden, der Prostaglandinproduktion, sowie den Oxidations-, Carboxylierungs- und Hydroxylierungsreaktionen beteiligt. Freie Radikale (*reactive oxygen species*; ROS) beteiligen sich auch an der Wirtsverteidigung gegen bakterielle Infektionen, an der Regulation vom Gefäßtonus sowie an Zelladhäsionsreaktionen und wirken als Sensor für die Sauerstoffkonzentration [37, 143].

In verschiedenen Studien wurde untersucht, ob mitochondriale Dysfunktion ein Grund für den veränderten Sauerstoffmetabolismus sein könnte [51].

So würde eine Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase zu einer Erhöhung der Laktatproduktion (ein Kriterium für den septischen Schock), sowie zu einer verminderten mitochondrialen energetischen Aktivität führen [140]. Ein zweiter Mechanismus reduziert die oxidierte sowie die reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺/NADH), und führt darüber hinaus zu einer Hemmung des Komplexes I (Ubichinon–Oxidoreduktase oder NADH-Dehydrogenase) der mitochondrialen Atmungskette (*mitochondrial respiratory chain*; MRC). Schließlich wurde auch gezeigt, dass Endotoxine über eine Erhöhung der Menge an Stickstoffmonoxid den MRC-Komplex IV (O₂-Oxidoreduktase oder Cytochrom-c-Oxidase) hemmen [137]. Dieser Komplex ist verantwortlich für die endgültige Sauerstoffreduktion in Wasser und seine Hemmung könnte zu einer mitochondrialen Dysfunktion und zu oxidativem energetischen Versagen auch in einer sauerstoffreichen Atmosphäre führen. Zusätzlich kann Stickstoffmonoxid die mitochondriale Adenosintriphosphat-Synthase (ATPase), die Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenodiphosphat (ADP) und Phosphat synthetisiert, hemmen [44, 100, 111, 123]. Mit anderen Worten Stress, der durch Sepsis auf die Zellen wirkt, kann zu mitochondrialer Dysfunktion führen. Die Mitochondrien können aber auch Ursache, oder zumindest Verstärker, solchen Stresses sein. Es gibt Hinweise darauf, dass Signale von gesunden Mitochondrien Stressreaktionen in Zellen induzieren können, zum Beispiel indem sie NF-kB oder p53 aktivieren [12]. Ebenso können Mitochondrien die metabolische Aktivität von Zellen supprimieren, indem sie die Adenosinmonophasphat (AMP)-abhängige Proteinase aktivieren [12]. Darauf deuten Proben von Patienten mit kritischen Erkrankungen und Organdysfunktion hin, deren Zellen aber eine normale Morphologie zeigten [12]. Möglicherweise wird dieser Mechanismus initiert um das Überleben der Zellen zu gewährleisten [12]. Diese Abnahme bestimmter mitochondrialer Funktionen, einschließlich der oxidativen Phosphorylierung, könnte darauf abzielen, die Produktion von ROS zu begrenzen, die sonst die Zellen weiter beschädigen würde [12]. Weitere Belege für das Herunterregulieren der Leistungsfähigkeit der Zellen sind Versuche, die zeigten, dass septisches Plasma dazu tendiert, den Sauerstoffverbrauch von gesunden Mitochondrien zu reduzieren [47]. Eine Studie von Garrabou et al. zeigte insbesondere bei Sepsis-Patienten mit negativem Ergebnis, signifikant erhöhte Mengen an extrazellulärer mitochondrialer DNA und entzündlichen Zytokinen im Plasma, verglichen mit Patienten mit positivem Outcome, obwohl diesem Plasma gesunde Mitochondrien hinzugefügt wurden [51]. Diese und auch andere Mechanismen, zum Beispiel ein Abfallen des Gehaltes an ATP, der Hauptenergieträger unserer Zellen, unter ein kritisches Maß oder das Ausschwemmen von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zellplasma, führen zum programmierten Zelltod (Apoptose) [67].

Seit der Identifizierung von Mitochondrien durch Elektronenmikroskopie in den 1950er Jahren ist klar geworden, dass Mitochondrien ein einzelnes dynamisches Netzwerk bilden, dessen Kontinuität durch ein ausgewogenes kontinuierliches Bewegen, Teilen und miteinander Verschmelzen aufrechterhalten wird [72, 97]. Dieses mitochondriale Netzwerk ermöglicht es, sich an Stress und einen Verlust des Membranpotentials anzupassen. Dazu gehören neben den genannten mitochondrialen Spaltungs- und Fusionsreaktionen (*mitochondrial fission and fusion*), Mitophagie und mitochondriale Biogenese [152]. *Mitochondrial fission and fusion* sind dynamische morphologische Veränderungen, die im mitochondrialen Netzwerk auftreten [56]. Die Spaltung wird als ein koordinierter Prozess erkannt, wobei das mitochondriale Netzwerk die beschädigten Elemente der Mitochondrien zu einer fokalen Region sequestriert und in das gesündere Netzwerk assimiliert, was zu einer Aufrechterhaltung des Membranpotentials beiträgt. Diese Prozesse wurden bei der Sepsis bisher unzureichend untersucht. In einem präklinischen Tiermodell der Sepsis wurde eine Störung von Spalt- und Fusionsreaktionen beschrieben, von der angenommen wurde, dass sie zu Zellschädigung und Apoptose beitragen kann [12, 56].

Zusammenfassend spielt die mitochondriale Dysfunktion als Ursache sowie als Folge des Organversagens eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Sepsis und korreliert oftmals mit der Schwere und der Prognose der Sepsis [51].

1.4. Auflösen der Entzündung

Der aktive Prozess des Auflösens einer Entzündungsreaktion (resolution of inflammation) rückte in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus auch der Sepsisforschung. Bereits vor hundert Jahren wurde von I. I. Metchnikoff beschrieben, dass Neutrophile, welche bei Entzündungen aus den Blutgefäßen in das entsprechende Gewebe einwandern, von Gewebsmakrophagen (big eaters) phagozytiert werden und somit das Ende der Entzündung einleiten [74]. Jahre später wurden durch die Arbeitsgruppe um Charles Serhan in selbstlimitierenden akuten entzündlichen Exsudaten erstmals neue Familien von Lipidmediatoren identifiziert, Resolvine, Protectine und Maresine genannt, welche die Auflösung der Entzündung aktiv stimulieren [115, 116, 119]. Dabei wird die Leukozyteninfiltration beendet, sowie die Entfernung der apoptotischen Neutrophilen und des Zelldetritus gefördert. Durch diese ersten Schritte wird bereits die Rückkehr zur Homöostase des betroffenen Gewebes eingeleitet. Bisher gingen Forscher davon aus, dass die Entfernung des Entzündungsreizes die Produktion von Botenstoffen verhindert, welche die Leukozytenrekrutierung fördern, und dass eine einfache Verdünnung dieser Botenstoffe ausreichend sei, eine weitere Rekrutierung von Leukozyten zu verhindern und somit passiv das Ende der Entzündung herbeiführt [116, 117, 119]. Heute weiß man jedoch, dass die Auflösung von Entzündung ein programmierter aktiver Prozess ist, Resolutionsphase (resolution of inflammation) genannt, welcher während des Lipid-Mediator-Klassenwechsels initiiert wird [116, 117, 119]. Dieser Prozess dient dazu, die Produktion der klassischen Initiatoren der akuten Entzündung, Prostaglandine und Leukotriene, auf spezialisierte vorauflösende Mediatoren (specialized proresolving mediators; SPM) zu wandeln [116, 117, 119]. Diese SPM sind Autakoide, welche lokal gebildet werden und ihre Wirkung lokal zeigen [119]. Diese werden ähnlich wie ihre Gegenspieler, die pro-inflammatorischen Mediatoren (Prostaglandine und Leukotriene, aber auch verschiedene Zytokine) aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFA) gebildet. Zu ihnen gehören Lipoxine, Resolvine, Protektine, Maresine und jeweils ihre Aspirin-getriggerten Formen [119]. Die zuerst entdeckten Mediatoren die entzündungsauflösende Eigenschaften zeigten, waren Lipoxine [115]. Wie auch die Prostaglandine die aus der Arachidonsäure (AA;), einer Omega-6-Fettsäure, gebildet werden, werden Lipoxine aus der AA gebildet und leiten die Auflösung der Entzündung ein [115]. Die nächsten Gruppen wurden in

selbstauflösenden entzündlichen Exsudaten entdeckt: Resolvine und Protectine [115, 119]. Diese neuen Mediatoren werden jedoch nicht aus der AA, sondern aus Omega-3-Fettsäuren gebildet. Die Omega-3-Fettsäuren gehören ebenfalls zu den PUFA. Hauptvertreter dieser Fettsäureklasse sind Alpha-Linolensäure (ALA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) [116]. Die Protectine werden aus der DHA synthetisiert, während Resolvine sowohl aus DHA als auch aus EPA generiert werden. Man unterscheidet je nach Ausgangsprodukt zwei Klassen von Resolvinen: Resolvine D (RvD), welche der DHA entstammen und Resolvine E (RvE), welche aus der EPA synthetisiert werden. Ebenfalls aus der DHA entstehen die oben genannten Maresine [115]. Resolvine und Protectine sind aufgrund ihrer aktiven Produktion während der Auflösungsphase einer Entzündung, der Grund für die aktuelle Annahme, dass der Prozess der Entzündungsauflösung ein aktiver statt ein, wie bisher angenommen, passiver Prozess ist [115, 116].

Ein weiterer Punkt der die Gruppe der Resolvine und Protectine hervorhebt, ist die Tatsache, dass sie im Vergleich zu weiteren antiinflammatorischen Produkten aus PUFAs (vor allem aus AA und DHA) eine deutliche größere Potenz zeigen und in vivo schon im Piko- oder Nanogrammbereich ihre Wirkung entfalten [115, 119-121].

Wie bereits beschrieben, ist Entzündung die Antwort unseres Körpers auf eindringende Erreger (und auch auf jegliche Veränderung der Homöostase sei es durch Krebserkrankungen oder durch chirurgische Eingriffe) [115]. Ebenfalls wurde schon beschrieben, wie pro-inflammatorische Mediatoren, darunter Prostaglandine, erzeugt werden um jene Entzündung hervorzurufen [115]. Dabei kommt es zur Erweiterung der Kapillaren, um die Infiltration der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut zu ermöglichen. Diese wiederum versuchen mittels ROS eingedrungene Erreger zu eliminieren. Bereits unter dem Thema der mitochondrialen Dysfunktion (Kapitel 1.3) beschrieben, sind ROS nicht nur hilfreich, sondern können auch dem Wirt selbst schaden.

Um jedoch eine Schädigung des Wirtes zu vermeiden, zum Beispiel in Form von chronischer oder systemischer Inflammation, muss eine Entzündung also wieder aufgelöst werden. Dabei spielen die Resolvine eine zentrale Rolle. Serhan et al. fanden heraus, dass Resolvine die Wanderung der Neutrophilen aus dem Blut ins Gewebe einschränken sowie die Produktion von Zytokinen und ROS reduzieren und damit das Ausmaß der gesamten Immunantwort mäßigen [115]. Außerdem verbessern Resolvine die Aufnahme von apoptotischen Zellen, Zelltrümmern und Mikroben durch Makrophagen und tragen so zu der Rückkehr zur Homöostase des Wirtes bei [115, 119]. Auch auf transkriptioneller sowie der translationalen Ebene zeigen SPM ihre Wirkung. So regeln sie Prostaglandine und Leukotriene (LTB₄, LTC₄, LTD₄), Chemokine und Zytokine (zum Beispiel TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12) herunter und regulieren somit Kardinalsymptome der Entzündung, wie zum Beispiel Ödeme [118]. Des Weiteren bedingen sie eine vermindernde Wirkung auf NF κ B assoziierte Gene [118]. SPM reduzieren jedoch nicht nur die Entzündung, sondern fördern auch die aktive Heilung indem sie die Reepithelisierung anregen und so die Geweberegeneration und die Wundheilung stimulieren [118].

Protrahierte Entzündungen, epitheliale und mikrovaskuläre Verletzungen können zu einer übermäßigen Fibrose führen, die die Organfunktion beeinträchtigt. In vielen Organen wie Lunge und Niere ist die Ursache unbekannt und kann zu erhöhter Morbidität führen. RvE1 und RvD1 schützen hier vor einer renalen Fibrose durch Reduktion von Kollagen I und IV [106, 118].

Zusammenfassend spielen SPM, insbesondere die Resolvine, wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Kontrolle und letztlich Auflösung von Entzündungen, Infektionen und Gewebeverletzungen.

1.5. Resolvin E1

In unserer Arbeit fokussierten wir uns vor allem auf die Resolvine, im Speziellen auf Resolvin E1 (RvE1). Wie bereits beschrieben stammt der Name von seiner potenten stereoselektiven Wirkungen bei der Auflösung von murinen Exsudaten in vivo [14]. Ebenfalls bereits erwähnt, entstehen Resolvine der E-Serie aus der EPA [38, 119, 138]. EPA ist vor allem in Kaltwasserfischen angereichert und wird aus der α-Linolensäure, einer essentiellen Omega-3-Fettsäure, synthetisiert [38, 119]. Aus dieser werden dann über mehrere Zwischenschritte die verschiedenen Resolvine hergestellt: Gefäßendothelzellen, welche COX 2 (Cyclooxygenase-2) exprimieren, die durch Aspirin modifiziert wurde, gewinnen aus EPA zunächst 18R-HEPE (18R-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid), welches dann via 5-LOX (Arachidonat-5-Lipoxygenase) auf Neutrophilen zu einem Zwischenprodukt für die Synthese von RvE1 und RvE2 umgewandelt wird [38, 119]. Auch Cytochrom p 450, aktiviert durch Viren oder Bakterien, kann EPA in 18R-HEPE konvertieren [38, 119, 138].

Aktuell sind drei verschieden Resolvine der Serie E bekannt. RvE1 (*5S*,*12R*,*18R-trihydroxy-6Z*,*8E*,*10E*,*14Z*,*16 eicosapentaenoic acid*) scheint dabei jedoch die potenteste anti-inflammatorische Wirkung zu besitzen: So vermindert Resolvin E3 (RvE3) die Infiltration von PMN aus dem Blut ins Gewebe, Resolvin E2 (RvE2) kann zusätzlich die Makrophagen zur Phagozythose von apoptotischen Zellen, Detritus und Erregern anregen, während RvE1 beide Funktionen und zusätzlich die Interleukin-12-Produktion, sowie die Migration dentritischer Zellen reguliert und die Thrombozythenaggregation hemmt [119].

Diese Wirkungen werden, soweit bisher bekannt, vor allem über zwei Rezeptoren verursacht: ChemR23 und BLT1 [9, 10, 118].

ChemR23 (*Chemerin Receptor 23*) oder alternativ auch *chemokine like receptor 1* (CMKLR1) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der ursprünglich als Rezeptor für Chemokin, ein unter anderem entzündungsmodulierendes Adipokin, dient. Über diesen Rezeptor vermittelt RvE1 eine Hemmung von NF-κB und führt somit zu einer Hemmung der Inflammation. Ferner gibt es Hinweise darauf, dass RvE1 M1-Makrophagen (proinflammatorischer Phänotyp) repolarisiert und in eine Art auflösungsfördernden Phänotypen umwandeln, welcher sich jedoch von den M2-Makrophagen (durch Aktivierung durch Interleukin 4 definiert) unterscheidet. Dieser modifizierte Typ, rM-

Makrophagen (*resolution phase macrophages*) genannt, wird durch die Produktion, jedoch nicht die Ausschüttung, von Interleukin 10 angeregt [65]. Des Weiteren beeinflusst die RvE1-ChemR23-Interaktion weitere Signalkaskaden, wie zum Beispiel Proteinkinase B (besser bekannt als Akt), oder Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3kinase (PI3K) [76, 98, 136].

Der BLT1-Rezeptor ist ein spezifischer Rezeptor für Leuktrien B4 und ist assoziiert mit proinflammatorischen Wirkungen. Dieser Rezeptor ist vor allem auf neutrophilen Granulozyten und Makrophagen exprimiert und ist somit für die Adhäsion dieser Zellen an das Endothel verantwortlich, sodass diese in das betroffene Gewebe transmigrieren können [131]. RvE1 interagiert mit dem BLT1-Rezeptor und blockiert die Wirkung des Leukotriens. Obwohl RvE1 nur als partieller Antagonist an den Rezeptor bindet, zeigt es sich doch mit einer ähnlichen Potenz wie der direkte Antagonist zu BLT1, U-75302 [10]. In Bindungsanalysen konnte jedoch gezeigt werden, dass RvE1 mit einer höheren Affinität an ChemR23 im Vergleich zu BLT1 bindet [9]. Und auch Arita et al. sahen in ihren Experimenten, dass RvE1 in höheren Dosen auch bei Mäusen mit geschädigten BLT1-Rezeptoren ihre Wirkungen unabhängig von diesem Rezeptor in ungefähr dem gleichen Maße wie in Wildtyp-Mäusen entfalteten [10].

Resolvine entfalten ihre Wirkungen bereits schon im Nanogrammbereich. Wahrscheinlich werden Resolvine nicht nur unter pathologischen Bedingungen generiert, sondern treten durchaus auch unter physiologischen Konditionen im Körper auf [92, 117]. RvE1 wurde in Plasma, Serum und Sputum von Menschen nachgewiesen [9, 27, 150].

Alle bisher beschriebenen Effekte wurden schon in den Abläufen der verschiedensten Pathologien entdeckt und in vitro und zum Teil auch in vivo nachgewiesen. So zum Beispiel in inflammatorischen Tiermodellen wie der Kolitis [11], Pneumonie, ALI [114] und Peritonitis [75].

So konnten Seki et al. im Tierversuch anhand aspirationsassoziierter Pneumonien zeigen, dass Resolvin E1 die pro-inflammatorischen Mediatoren verringert und damit das Überleben der aspirationsassoziierten Pneumonie verbessert [114]. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass sogenannte fat-1-Mäuse, welche zu endogener Omega-3-Fettsäuren-Synthese befähigt sind, vor allergischen Atemwegsentzündungen besser geschützt sind [18]. Hecker et al. konnten an jenen Mäusen ein verbessertes Outcome aus dem ALI nachweisen [60]. Möglicherweise lassen sich diese positiven Effekte der aspirationsassoziierten Pneumonie auf das breite Spektrum der pulmonalen Inflammation ausweiten.

1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Das Krankheitsbild der Pneumonie kommt sehr häufig vor und ist in den meisten Fällen gut behandelbar. Trotzdem ist die Zahl der Fälle mit schwerem oder sogar letalem Verlauf, insbesondere bei septischen Komplikationen, noch inakzeptabel hoch.

Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von Resolvin E1 auf pulmonale Inflammation zu untersuchen, mit besonderem Augenmerk auf die mitochondriale Atmung.

Wie oben beschrieben ist mitochondriale Dysfunktion vielleicht der Grund für die Schwere der Verläufe, sodass wir in einem weiteren Ansatz den Einfluss der Fission-Inhibitoren Mdivi und Dynasore auf die pulmonale Entzündung untersuchten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Blot-Kammer mit Einsätzen

Mini-Protean Tetra System, BIO-RAD Laboratories, München

Brutschrank

Hera Cell, Heraeus, Hanau

Druckkolbenpipetten

Eppendorf Research Volumen bis 10µl, 100µl und 1000µl, Eppendorf, Hamburg

Multipette Stream, Eppendorf, Hamburg

Elisa-Reader

Elx808, BIO-TEK, Instruments, Bad Friedrichshall

Gel-Dokumentation

Chemidoc XRS+, BIO-RAD Laboratories, München

Heizblock

HTM130, HLC BioTech, Bovenden

Mikroskop

Axiovert S100, Carl Zeiss, Oberkochen

PCR-Cycler

Thermol Cycler T100, BIO-RAD Laboratories, München

CFX Connected Real - Time PCR Detection System, BIO-RAD Laboratories, München

pH-Meter

pH-Meter 766 Calimatic, KNICK, Berlin

Pipettierhilfe

Pipetboy 2, Integra Biosciences, Fernwald

Reinstwasseranlage

Milli-Q, Millipore, Schwalbach

Respirometer

Oroboros O2k, Oroboros Instruments Corp, Innsbruck, Österreich

RNA/DNA Konzentrationsbestimmung

NanoDrop ND-1000, Kisker-Biotech, Steinfurt

Schnellblotkammer

Trans-Blot Turbo Blotting System, BIO-RAD Laboratories, München

Schüttler

Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach

Roller Mixer SRT6, STUART, Staffordshire, Großbritannien

Spannungsquelle

Power Supply EV231, Consort, Turnhout, Belgien

Power Supply EA835, Consort, Turnhout, Belgien

Sterilwerkbank

HS 15, Heraeus, Hanau

Tiefkühlschrank

Herafreeze, Heraeus, Hanau

Vortexer

Analog Vortex Mixer, VWR, Darmstadt

Waage

PB303 Delta Range, Mettler Toledo, Gießen

Wasserbad

Thermomix BU, Braun Melsungen, Melsungen

Zentrifugen

Rotina 46R, Hettich, Tuttlingen

Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen

Tischzentrifuge Sprout, Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA

Zellkulturgefäße

Zellkulturflasche 250 ml Cellstar TC steril, Greiner Bio-One, Frickenhausen Zellkulturschale 35x10 mm Cellstar TC steril, Greiner Bio-One, Frickenhausen Zellkulturschale 100x20 mm Cellstar TC steril, Greiner Bio-One, Frickenhausen TC-Platte 6 Well Standard F, Sarstedt, Nürnbrecht

Zellharvester

CellScraper 25 cm, Sarstedt, Nümbrecht

2.1.2. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

96-Well-Platte

Hard-Shell® PCR Plates, 96-well, thin-wall, BIO-RAD Laboratories, München

Ammoniumpersulfat

Ammoniumpersulfat (APS), Sigma-Aldrich, Steinheim

Aufsätze Multipette

1 ml, 5 ml und 10 ml Combitips advanced, Eppendorf, Hamburg

BLT-1-Antagonist

CP-105696, Sigma-Aldrich, Steinheim

Bovines Serum Albumin (BSA)

BSA, Sigma-Aldrich, Steinheim

Deckgläser

Deckgläser, R. Langenbrinck, Emmendingen

Dimethylsulfoxid

DMSO, Sigma Aldrich, Steinheim

Dithiothreitol

Dithiothreitol (DTT), Sigma-Aldrich, Steinheim

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, High Glucose, PAN Biotech, Aidenbach

Dynasore

Dynasor hydrate, Sigma-Aldrich, Steinheim

Einmalpipetten

Pipette 5 ml/10 ml, steril, einzeln verpackt, Greiner Bio-One, Frickenhausen

FisherbrandTM Transferpipetten, steril, graduiert, Thermo Scientific, Braunschweig

Elektophoresepuffer

Lämmli sample buffer, BIO-RAD Laboratories, München

Ethanol

Ethanol (reinst) für Molekularbiologie, Sigma-Aldrich, Steinheim

Ethanol, Otto Fischer, Saarbrücken

Falconröhrchen

15 ml/50 ml Falcon-Tubes, Becton Dickinson, Heidelberg

Fetales Kälberserum (FCS) FCS, PAA Laboratories, Cölbe Folie für 96-Well-Platte Optically Clear Heat Seal, BIO-RAD Laboratories, München Glyzin Glycine Pufferan®, Roth, Karlsruhe Mdivi Mdivi-1, Sigma Aldrich, Steinheim Medium für Zellkultur Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose, Sigma Aldrich, Steinheim Mercaptoethanol β-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, Steinheim **Methanol** Methanol (reinst), Sigma-Aldrich, Steinheim **Mikrotiter-Platten** Nunc Immuno Plate, Thermo Scientific, Braunschweig Milchpulver Skim Milk Powder, Sigma-Aldrich, Steinheim Natriumchlorid Natriumchlorid p.a., Sigma-Aldrich, Steinheim Natriumdodecylsulfat Natriumdodecylsulfat (SDS) ultrapure, Roth, Karlsruhe Neubauer Zählkammer Neubauer Zählkammer, VWR, Darmstadt **Penicillin/Streptomycin** Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin), PAN- Biotech, Aidenbach Phosphataseinhibitor Pierce Phosphatase Inhibitor mini tablets, Thermo Scientific, Massachusetts, USA Polymerisationskatalysator N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Sigma-Aldrich, Steinheim

Polysorbat 20 Tween 20, Sigma-Aldrich, Steinheim Propanol 2-Propanol p.a., Sigma-Aldrich, Steinheim **Proteaseinhibitor** Proteaseinhibitor Cocktail tablets, Roche, Mannheim **Protein-Marker** Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific, Braunschweig Reaktionsgefäße 1,5 ml und 0,5 ml Safe Seal Tube, Sarstedt, Nümbrecht Reagiergefäß 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht Resolvin Resolvin E1, Cayman Chemical, Michigan, USA Röntgenfilm Agfa®X-Ray Film, VWR, Darmstadt Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Lafayette, USA Salzsäure 37 % Salzsäure, Merck, Darmstadt Schwefelsäure 1M Schwefelsäure, Roth, Karlsruhe Sterilfilterspitzen TF 1000-L-R-S, Axygen, Tewksbury, USA TF 100-L-R-S, Axygen, Tewksbury, USA TF 10-L-R-S, Axygen, Tewksbury, USA Stickstoff (flüssig) Stickstoff (flüssig), Linde Gas, Mainz-Kostheim Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (TRIS), Roth, Karlsruhe Trypsin Trypsin/EDTA-Lösung, PAN Biotech, Aidenbach **Tumor Nekrose Faktor α (TNFα)** Recombinant Human TNF-alpha, R&D, Minneapolis, USA

Wasser

Gibco RNase/DNase-freies Wasser, Thermo Scientific, Braunschweig

Western Blot Laufgel

TGXTM TGX Stain FreeTM Fast CastTM Acrylamide Kit, Biorad Laboratories, München

Western Blot Luminol Reagenz

ECL Westernblotting Substrate, Thermo Scientific, Braunschweig

Western Blot Transfer Membran

Immobilon-P Transfer Membran (PVMD-Membran), Millipore, Schwalbach

Zellen

A549-Zellen, ATCC, Wesel

Zelllysepuffer

Cell Lysis Buffer, Cell Signaling, Danvers, USA

2.1.3. Verwendete Kits

Apoptose-Array, R&D, Minneapolis, USA Human IL-6 DuoSet ELISA, R&D, Minneapolis, USA Human IL-8 DuoSet ELISA, R&D, Minneapolis, USA Human IL-10 DuoSet ELISA, R&D, Minneapolis, USA RNeasy mini Kit, Qiagen, Hilden DNeasy blood & tissue Kit, Qiagen, Hilden Platinum SYBR Green qPCR SuperMix, Invitrogen, Karlsruhe Zellstress-Array, R&D, Minneapolis, USA

2.1.4. Verwendete Primer

GAPDH	for: 5'-AGCACCAGGTGGTCTCCTCT-3'
	rev: 5'-CTCTTGTGCTCTTGCTGGGG-3'
Fis-1	for: 5'-GGAGGACCTGCTGAAGTTTG-3'
	rev: 5'-ACGATGCCTTTACGGATGTC-3'
DLP1	for: 5'-AAGAACCAACCACAGGCAAC-3'
	rev: 5'-TTTTCGTGCAACAGGAACTG
OPA1	for: 5'-GGCCAGCAAGATTAGCTACG-3'
	rev: 5'-ACAATGTCAGGCACAATCCA-3'
MFN1	for: 5'-TTGGAGCGGAGACTTAGCAT-3'
	rev: 5'-TTCGATCAAGTTCCGGATTC-3'
MFN2	for: 5'-TGCCTCAGAGCCCGAGTA-3'
	rev: 5'-CTGGTACAACGCTCCATGTG-3'
ND1	mtF3212: 5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3'
	mtR3319: 5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTAA-3'

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Allgemein

In dieser Arbeit wurden A549-Zellen von ATCC verwendet. A549-Zellen sind eine spezifizierte humane Zelllinie, welche 1972 von Donald J. Giard am MIT etabliert wurde. Die Originalzellen stammen von einem explantierten Adenokarzinom der Lunge [54]. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die A549-Zelllinie für die Untersuchung der metabolischen und makromolekularen Verarbeitungsbeiträge von Alveolartyp-II-Zellen zu Mechanismen der Arzneimittelabgabe am Lungenepithel nützlich sein kann [45].

Die Zellen wurden für die Versuche in Zellkulturflaschen von Greiner Bio-One (Frickenhausen) in *Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose* (DMEM) ausgesäht. Dem DMEM wurden dabei 1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin), sowie 5 % fetales Kälberserum (BSA) hinzugefügt. Bevor die Zellen den gesamten Boden des Zellkulturgefäßes bedecken konnten, wurden diese 1:3, 1:5 oder 1:10 gesplittet. Für die Experimente wurden die Passagen 20-30 verwendet. Zum Lösen der Zellen vom Boden der verwendeten Zellkulturgefäße wurde 0,05/0,02 % Trypsin/EDTA-Lösung verwendet. Das Medium wurde wenn nicht anders beschrieben alle zwei Tage gewechselt. Alle Zellen wurden zum Kultivieren, sowie für die Experimente in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) in einer wasserfdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5,0 % CO₂-Gehalt aufbewahrt.

2.2.1.2. Zellversuche mit Resolvin E1

Für die Messung der Zellatmung bei den Versuchen mit Resolvin E1 (RvE1) wurden 500.000 Zellen in Zellkulturschälchen (35x10 mm) von Greiner Bio (Frickenhausen) in 1 ml Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die entsprechenden Schälchen mit 10 ng/ml humanen Tumornekrosefaktor α (TNF- α) stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden den entsprechenden Schälchen 50 nM RvE1 hinzugefügt. RvE1 wurde nach Herstellerangaben vorbereitet.

Je Experiment wurden vier Schalen angesetzt: Kontrolle, TNF, Kontrolle + RvE1, TNF + RvE1. Nach weiteren zwei Stunden Inkubationszeit mit RvE1 wurden die Zellen abtrypsiniert, das heißt vom Boden des Zellkulturgefäßes mittels der oben beschriebenen Trypsinlösung gelöst, mit DPBS und 5 % FCS bei 1200 rpm und 20 °C für zehn Minuten zentrifugiert und anschließend wurde das Pellet in je 2,5 ml resuspendiert. Im Folgenden wurden die Proben direkt in die Untersuchungskammern des Oxygraphen überführt (siehe Kapitel 2.2.4). Vor der Zentrifugation wurden die Zellen mittels Neubauer Zählkammer gezählt.

Die Proben für die Western Blot (WB) -Versuche wurden folgendermaßen vorbereitet. Hierzu wurden 1,5 Mio Zellen in Zellkulturschalen (100x20 mm) von Greiner Bio-One (Frickenhausen) in 10 ml Medium ausgesät. Auch hier erfolgte wieder die Aufteilung in die vier Kategorien wie oben beschrieben zu je gleicher Anzahl. Aufgrund der größeren Wachstumsfläche wurde erst nach 48 Stunden das Medium gewechselt und mit 10 ng/ml TNF stimuliert. Nach 24 Stunden wurden 50 nM RvE1 hinzugefügt. Nach weiteren zwei Stunden Inkubationszeit wurden aus den Überständen Proben für die weitere Verarbeitung mittels ELISA entnommen und bei -80 °C eingefroren. Das restliche Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit DPBS gewaschen. Wie weiter mit den Zellen verfahren wurde siehe Kapitel 2.2.6 Western Blot.

Für die Untersuchungen der RNA wurden 500.000 Zellen in 2 ml Medium in einer 6-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht) ausgesäht. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und anschließend wurden die Zellen mit 10 ng/ml TNF stimuliert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die entsprechenden Proben für weitere zwei Stunden mit 50 nM RvE1 versetzt. Zum Beenden der Experimente wurden die Proben zweimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 350 μl RLT-Puffer aus dem RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden) mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Der RLT-Puffer wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Die Lösung wurde in ein Eppendorf-Tube überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Für die Untersuchungen der DNA wurden die Proben wie oben für die Versuche zur RNA beschrieben vorbereitet. Nach dem Waschen mit DPBS wurden die Zellen mittels Zellharvester in 350 µl DPBS vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst und direkt in ein Eppendorf-Tube überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.3. Zellversuche mit Mdivi und Dynasore

Für die Messung der Zellatmung bei den Versuchen mit Mdivi-1 (Mdivi) und Dynasore (DY) wurden 750.000 Zellen für die Versuche mit Mdivi und 500.000 Zellen für die Versuche mit DY in Zellkulturschalen (35x10 mm) von Greiner Bio (Frickenhausen) in 2 ml Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die entsprechenden Schalen mit 50 µM Mdivi oder 50 µM DY stimuliert. Nach 30 min Inkubationszeit wurden den entsprechenden Schalen mit 10 ng/ml (TNF) stimuliert. Je Experiment wurden je vier Schalen vorbereitet: Kontrolle, TNF, Kontrolle + Mdivi, TNF + Mdivi, Kontrolle + DY, TNF + DY. Die Schalen mit der Aufschrift Kontrolle und TNF wurden für je beide Settings vorbereitet. Nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen wie unter 2.2.1.2 beschrieben abtrypsiniert und das Pellet wurde in je 2,5 ml resuspendiert. Danach wurden sie direkt in die Untersuchungskammern des Oxygraphen überführt (siehe Kapitel 2.2.4). Auch hier erfolgte die Bestimmung der Zellzahl vor dem Zentrifugationsschritt.

Die Proben für die Western Blot (WB) Versuche wurden folgendermaßen vorbereitet. Hierzu wurden 1,5 Mio Zellen in Zellkulturschalen (100x20 mm) von Greiner Bio-One (Frickenhausen) in 10 ml Medium ausgesät. Auch hier erfolgte wieder die Aufteilung in die sechs Kategorien wie oben beschrieben zu je gleicher Anzahl. Nachdem die Zellen zu zirka 80 % konfluent waren (in der Regel nach 48 Stunden) wurde das Medium gewechselt und die entsprechenden Schalen mit 50 µM Mdivi oder 50 µM DY stimuliert. Nach 30 min wurden 10 ng/ml TNF hinzugefügt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden aus den Überständen Proben für die weitere Verarbeitung mittels ELISA entnommen und bei -80 °C eingefroren. Das restliche Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit DPBS gewaschen. Wie weiter mit den Zellen verfahren wurde siehe Kapitel 2.2.6 Western Blot.

Für die Untersuchungen der RNA wurden 500.000 Zellen in 2 ml Medium in einer 6-Well-Platte (Sarstedt, Nürnbrecht) ausgesäht. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und anschließend wurden die Zellen mit 50 μ M Mdivi oder 50 μ M DY stimuliert. Nach 30 Minuten wurden 10 ng/ml TNF hinzugefügt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Experimente beendet. Hierzu wurden die Proben zweimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 350 µl RLT-Puffer aus dem RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden) mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Der RLT-Puffer wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Die Lösung wurde in ein Eppendorf-Tube überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Für die Untersuchungen der DNA wurden die Proben wie oben für die Versuche zur RNA beschrieben vorbereitet. Nach dem Waschen mit DPBS wurden die Zellen mittels Zellharvester in 350 µl DPBS vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst und direkt in ein Eppendorf-Tube überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.4. Zellversuche zu BLT-1

Zum Nachweis der Funktionalität des BLT-1-Rezeptors in A549-Zellen wurden 500.000 Zellen in Zellkulturschalen (35x10 mm) von Greiner Bio (Frickenhausen) in 1 ml Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die entsprechenden Schalen mit 10 ng/ml humanen Tumornekrosefaktor α (TNF- α) stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden den entsprechenden Schalen 50 nM RvE1 hinzugefügt. RvE1 wurde nach Herstellerangaben vorbereitet. 30 Minuten vor der Inkubation mit RvE1 wurde 1 µM BLT-1-Antagonist CP-105,696 den entsprechenden Schalen zugeführt.

Je Experiment wurden acht Schalen vorbereitet: Kontrolle, TNF, Kontrolle + RvE1, TNF + RvE1, Kontrolle + Inhibitor, TNF + Inhibitor, RvE1 + Inhibitor, TNF + RvE1 + Inhibitor. Nach weiteren zwei Stunden Inkubationszeit wurden aus den Überständen Proben für die weitere Verarbeitung mittels ELISA entnommen und bei -80°C eingefroren.

2.2.2. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

Verwendeter Immunfarbstoff:

dy999, R&D, Minneapolis, USA

Mittels ELISA wurden aus den gewonnenen Proben (beschrieben unter 2.2.1.2 und 2.2.1.3) die Konzentrationen der Interleukine IL-6, IL-8 und IL-10 bestimmt.

Die in dieser Arbeit genutzten ELISA Kits (Human IL-6, IL-8, IL-10 DuoSet ELISA) nutzen das Sandwich-ELISA-Prinzip [107].

Die Detektion erfolgte jeweils mit Meerrettichperoxidase, welches das farblose Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), zu einem gelben Farbstoff oxidiert. Es wurde jeweils nach Herstellerprotokoll verfahren. Dabei wurden jedoch der Waschpuffer aus DPBS und 0,05 % Tween sowie die Verdünnungslösung aus DPBS und 1 % BSA selbst hergestellt. Als Stopplösung wurde 1M Schwefelsäure verwendet.

Als TMB Substrat wurde dy999 (R&D, Minneapolis, USA) verwendet. Die Absorption wurde mit dem Elisa-Reader Elx808 gemessen und die Auswertung mit dem Programm Gen5 durchgeführt.

2.2.3. Zellstress- und Apoptose-Arrays

Die relativen Konzentrationen von Proteinen in Bezug auf humane Zellen, die mit Stress und Apoptose zusammenhängen, wurden in vorbehandelten Zelllysaten unter Verwendung von Antikörper-Arrays auf Membranbasis gemäß den Anweisungen des Herstellers (Human Cell Stress Antibody Array, Human Apoptosis Array, beide von R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland erworben) bestimmt. Um die Fleckenintensität zu bewerten, wurden Blots von drei unabhängigen Prüfern visuell bewertet. Die im Manuskript markierten Stellen waren die, die von allen drei Prüfern als verändert beschrieben wurden. Zur Datenanalyse wurden die Pixeldichten auf entwickelten Röntgenfilmen von Flecken mit deutlichen Änderungen mit einem Transmissionsmodus-Scanner und einer Bildanalyse-Software (ImageLab 4.0.1, Bio-Rad Laboratories) analysiert.

2.2.4. Messung der Zellatmung

2.2.4.1. Messung der Proben mittels High-Resolution-Respirometry Verwendete Materialien

Antimycin a, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland FCCP (*carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*), Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Oligomycin, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Oxygraph O2k, Oroboros Instruments Corp, Innsbruck, Österreich

10 µl Hamilton-Präzisionsspritze, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Die Messung

Die Zellatmung wurde mittels hochauflösender Respirometrie (*high-resolution respirometry*) gemessen. Hierzu wurde der Oxygraph-2k von Oroboros Instruments (Innsbruck, Österreich) verwendet. Prinzipiell wurde mittels Sensor der Sauerstoffgehalt in den Kammern des Gerätes gemessen und im Graphen gegen die Zeit aufgetragen. Bei vorher definierten Volumen und Zellzahl ließ sich so der Sauerstoffverbrauch der Zellen in pmol je Million Zellen und Sekunde bestimmen. Die Aufzeichnung des Graphen erfolgte mit der DatLab-Software "DatLab5" (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich).

Wie oben beschrieben wurden die Zellsuspensionen vorbereitet und in die jeweilige Messkammer der Oxygraph-2k-Vorrichtung überführt. Nach Eingeben der Zellzahl wurden die Kammern verschlossen und die Messung begonnen. Während der gesamten Messung wurde die Temperatur kontinuierlich bei 37 °C gehalten. Um eine gleichmäßige Lösung beizubehalten, arbeitete in den Kammern ein Rührer mit 750 U/min. Die Messung erfolgte in Echtzeit (Zeitintervalle von 2 Sekunden).

Zunächst wurde die physiologische Atmung intakter Zellen gemessen. Hierbei handelt es sich um die Ruheatmung oder auch Routineatmung (*routine respiration*) genannt. Nach dem sich dieses Gleichgewicht einstellte, wurde je Kammer 1 μ l Oligomycin (Endkonzentration 2,5 μ M) hinzugefügt um die ATP-Synthase zu inhibieren. Dass hier neu eingestellte Gleichgewicht ist das sogenannte LEAK-Gleichgewicht (*leak respiration*). Nun begann die Titration von je 1 μ l FCCP (siehe unten), die finale Konzentration betrug 0.5 μ M je Titrationsschritt, um die maximale mitochondriale Atmung (*maximal* *respiration*) festzustellen. Zum Abschluss der Messung wurde 1 μ l Antimycin A, hinzugefügt um den nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch zu bestimmen. Die endgültige Konzentration beträgt hier 2,5 μ M.

Die Abbildung 1 verdeutlicht noch einmal den Ablauf solch eines Versuches.



Abbildung 1: Standardablauf eines Experimentes zur Bestimmung der mitochondrialen Atmung unter Nutzung der *high-resolution respirometry*. Die graue Linie stellt den Sauerstoffgehalt in der Kammer dar, die Schwarze die mitochondriale Atmung. Die wichtigsten Parameter sind in den grauen Boxen hinterlegt: *Routine = Routine respiration, Leak = Leak respiration, Max = Maximal respiration*

2.2.4.2. Oligomycin

Oligomycin ist ein Inhibitor der ATPase und blockiert damit die Phosphorylierung von ADP zu ATP [40].

Das benutzte Oligomycin wurde bei Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) bestellt. Die Lösung für die Experimente wurde nach den Angaben von oroboros instruments vorbereitet. Hierzu wurden 4 mg des Stoffes in 1 ml Ethanol gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3. FCCP

Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon, kurz FCCP ist ein künstlich hergestellter Entkoppler der Atmungskette. Entkoppler bauen den, durch die Atmungskette, aufgebauten, Photonengradienten ab und nehmen damit der ATPase ihren Antrieb. Dies führt dazu, dass die Kette von Komplex I bis Komplex IV vollständig durchlaufen wird,
jedoch kein ATP synthetisiert werden kann. Zusätzlich laufen die Reaktionen an den Komplexen schneller ab, da die Elektronen nicht mehr gegen den elektrochemischen Gradienten transportiert werden müssen [128].

Das benutzte FCCP wurde bei Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) bestellt. Die Lösung für die Experimente wurde laut Oroboros Instruments vorbereitet. Hierzu wurden 1,27 mg FCCP in 5 ml Ethanol gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.4.4. Antimycin A

Das Antibiotikum Antimycin A hemmt den Komplex III (Cytochrom c-Reduktase). Es blockiert die Übertragung von Elektronen vom Cytochrom b auf Cytochrom c. Die Komponenten der Atmungskette vor dem Wirkungsort von Antimycin A im Komplex III bleiben reduziert, alle nachfolgenden bleiben oxidiert. Dadurch werden der Verbrauch von Sauerstoff an Komplex IV und die Synthese von ATP im Komplex V gehemmt [68]. Auf diese Weise sinkt der Sauerstoffverbrauch der Zellen.

Das benutzte Antimycin a stammt von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) und wurde laut dem Hersteller des Oxygraphen O2k verarbeitet. Hierzu wurden 5,4 mg in 2 ml Ethanol gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.5. Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die PCR dient grundsätzlich zur Amplifikation definierter DNA-Fragmente und wurde 1987 von Kary Mullis entwickelt [94]. Um eine PCR durchzuführen, benötigt man DNA, Primer (Oligonukleotide), die die Enden des gewünschten DNA-Fragments definieren und Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP) sowie eine Polymerase zur Synthese des neuen DNA-Stranges.

Im ersten Schritt wurde die DNA-Matrize bei 95 °C denaturiert, d. h. dass der Doppelstrang sich in zwei Einzelstränge auftrennte. Hieran lagern sich dann die Primer bei 40 -60 °C abhängig von deren Schmelzpunkt an. Dieser Vorgang wird Annealing genannt. Es folgt die Elongation, die Synthese des neuen komplementären DNA-Stranges, bei 60 - 72 °C durch die Polymerase. Die Polymerasen sind hitzebeständig und nach einem weiteren Denaturierungsschritt weiterhin aktiv, sodass die Schritte Denaturierung, Annealing und Synthese bis zu 40-mal hintereinander wiederholt werden konnten. In der RT-PCR wurde nun die Menge einer bestimmten RNA in einer Probe bestimmt. Hierzu wurde die RNA aus der Probe isoliert (siehe unten Isolierung der DNA/RNA) und die gesamte RNA in cDNA umgeschrieben (siehe unten Umschreiben in cDNA). Die cDNA der gesuchten RNA wurde nun spezifisch durch ein geeignetes Primer-Paar amplifiziert und die neu gebildeten DNA-Fragmente quantifiziert. Hierfür wurde Platinum SYBR Green[®] (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Es emittierte, durch Anregung mit blauem Licht (λmax= 494nm) und nur nach Interkalierung in doppelsträngige DNA, grünes Licht (λmax= 521nm). Die Intensität dieser Emission ist proportional zur vorhandenen DNA-Menge, und diese kann durch Bestimmung der Emissionsintensität in Abhängigkeit zur PCR-Zyklusanzahl (Ct) bestimmt werden. Wenn keine definierte Menge des zu bildenden DNA-Fragments in der RT-PCR zur Kalibrierung eingesetzt wird, kann dennoch die Menge ein und desselben DNA-Fragmentes semiquantitativ analysiert werden. Da SYBR Green unspezifisch in jede doppelsträngige DNA interkaliert, wurde die Spezifität des RT-PCR Produktes durch eine Schmelzkurvenanalyse bestimmt.

Die Ergebnisse der RT-PCR werden in delta - Ct Werten angegeben, die folgendermaßen berechnet wurden:

 $\Delta Ct = Ct \; H_{ousekeeping \; Gen} - Ct \; _{Ziel\text{-}Gen}$

Nach demselben Protokoll wurde auch die mitochondriale DNA (mtDNA) bestimmt.

Isolierung der DNA

Zum Isolieren der DNA aus den Proben wurde das DNeasy blood & tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet und dabei nach Angaben des Herstellers verfahren.

Isolierung der RNA

Zur Isolierung der RNA wurde das RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden) benutzt und das Protokoll vom Hersteller zur "Isolierung von RNA von tierischen Zellen mittels Zentrifugation" befolgt.

Umschreiben in cDNA

Nach der Isolierung musste die vorhandene RNA in cDNA umgeschrieben werden um diese für die PCR nutzen zu können. Zunächst wurde der RNA-Gehalt der Proben bestimmt. Hierzu wurde der NanoDrop ND-1000 (Kisker-Biotech, Steinfurt) benutzt.

Danach wurden zunächst Aliquots der Proben mit jeweils gleichem RNA-Gehalt erstellt. Hierzu wurde die geringste Konzentration mit vier multipliziert (die vier ergibt sich aus dem maximal möglichen einsetzbaren Volumen) um eine Zielgröße zu erhalten, jedoch wurden nicht mehr als 1 μ g RNA eingesetzt. Diese Aliquots entsprechen dem Ansatz in dem darauffolgenden Protokoll.

Um nun die vorhandene RNA in cDNA umzuschreiben wurde das ImProm-II Reverse Transcriptase Kit (Promega, Mannheim) verwendet und die Proben wurden nach Herstellerprotokoll vorbereitet. Für die Amplifikation der cDNA wurde der Thermal Cycler T100 (BIO-RAD Laboratories, München) verwendet. Anschließend wurde die cDNA 1:10 mit Wasser verdünnt und die Proben bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

PCR

Für die eigentliche PCR wurde folgender Ansatz mit dem jeweiligen Primer in eine 96-Well-Platte gegeben:

Ansatz:

12,5 µl Platinum SYBR Green qPCR SuperMix

1 µl Primergebrauchslösung (10 pM Vorwärts- und Rückwärtsprimer)

1 µl MgCl₂-Lösung (50 mM)

1 µl cDNA (5 ng)

9,5 µl Wasser

Wenn es nötig war, mehr DNA/cDNA einzusetzen wurde die entsprechende Menge weniger Wasser verwendet um die Gesamtmenge von 25 µl nicht zu überschreiten. Die Primergebrauchslösung bestand aus je 20 µl Vorwärts- und Rückwertsprimer-Stock-Lösung, welche nach Herstellerangaben hergestellt wurde, sowie 160 µl RNase/DNase-freien Wasser. Nachdem die 96-Well-Platte mit *Optical clear heat seal* - Folie (BIO-RAD Laboratories, München) verschlossen wurde, wurde folgendens Programm im CFX Connected Real – Time PCR Detection System (BIO-RAD Laboratories, München) durchlaufen.

qRT-PCR Programm:

2 min 50 °C, 2 min 95 °C, (10 s 95 °C, 20 s 60 °C)*40, Schmelzkurvenanalyse (1 min 95 °C, 30 s 55 °C, 30 s 95 °C)

Unter 2.1.4 können die verwendeten Primer eingesehen werden. GAPDH diente dabei als Referenzgen.

2.2.6. Western Blot

Vorbereitung der A549-Zellen

Nach dem Waschen der Zellen wie unter 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschrieben wurden die Zellen in 250 µl DPBS mit einem Zellharvester (Sarstedt, Nürnbrecht) vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst und mit 20 ml DPBS zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 250 µl Lysis-Buffer versetzt.

10 ml Lysis-Buffer bestehen aus 1ml Cell Lysis Buffer (Cell Signaling), 9 ml destilliertem Wasser und je einer Tablette Pierce Phosphatase Inhibitor mini tablets und Proteaseinhibitor Cocktail tablets. Die Proben samt Lysis-Buffer wurden gevortext, kamen für 5 Minuten auf Eis und wurden anschließend mit 14000 g bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Westernblotting

Vor dem eigentlichen Western Blot wurde zunächst der Proteingehalt der Proben bestimmt, um vergleichbare Mengen einsetzen zu können. Hierzu wurde der DC[™] Protein Assay (Biorad Laboratories, München) nach Herstellerprotokoll verwendet. Der Proteinstandard wurde mit BSA (Biorad Laboratories, München) erstellt. Der Assay basiert auf einer Kupfer-Bindung an die Proteine, die nun das Substrat Folin reduzieren und dabei einen blauen Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 750 nm bilden. Die Absorption wurde im Elisa-Reader Elx808 gemessen und mit dem Programm GEN5 ausgewertet. Nach der Proteinbestimmung wurden entsprechend den nachfolgenden Western Blot-Versuchen Aliquots erstellt und diese bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Der eigentliche Western Blot besteht aus zwei Schritten. Zuerst müssen die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden um dann im Blottingverfahren auf eine Immobilon-P Transfer Membran (PVMD-Membran, Millipore) transferiert (geblottet) zu werden.

Aufgrund der Größe der verschiedenen Proteine und der Möglichkeit teilweise denselben Sekundärantikörper zu verwenden, wurden zur Auftrennung der Proteine 10 %- und 12 %-Trenngele verwendet. Die Gele für das Wetern Blot-Verfahren bestehen aus einem Sammelgel, welches bei jedem Gel dieselbe Zusammensetzung aufweist und dem Trenngel mit der unterschiedlichen Menge an Acrylamid.

Für die Herstellung der Gele wurde das TGX[™] TGX Stain Free[™] Fast Cast[™] Acrylamide Kit von Biorad verwendet. Hierbei wurde nach Herstellerangaben verfahren und den Gelen zum Polymerisieren noch TEMED und 10 -ige APS-Lösung als Katalysator hinzugefügt.

Um diese Gele zu gießen, wurde zunächst das Mini-Protean-Tetra-System von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers zusammengebaut, das noch unpolymerisierte Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit 100 -igen 2-Propanol bedeckt. Nach Aushärten des Gels, nach etwa 20 Minuten, wurde das 2-Propanol abgekippt und das noch nicht polymerisierte Sammelgel eingefüllt. In das noch flüssige Gel wurden die Kämme eingeschoben, die die späteren Probentaschen bildeten. Nach mindestens 1,5 Stunden war das Gel ausgehärtet und die Kämme konnten entfernt werden.

Nachdem die Gele fertig waren, wurden sie in die Elektrophorese-Kammer von Bio-Rad eingespannt und diese mit einfachem Laufpuffer gefüllt. Der 5x-Laufpuffer bestand aus 15,1 g TRIS, 94 g Glyzin, 50 ml 10 %-SDS und 1 L Aqua dest. Diese Zusammensetzung wurde dann zur Benutzung 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

Parallel zum Vorbereiten der Gele, wurden die entsprechenden Volumen der Proben mit vierfachem Lämmli sample buffer (Biorad) versetzt und 5-10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Der Lämmli sample buffer wurde zuvor nach Herstellerangaben mit Dithiothreitol versetzt. Die Probenmenge richtete sich nach dem Proteingehalt. Eingesetzt wurden 25 μ g je Probe.

Nach Einbringen der Proben und des Rainbow-Markers Spectra BR (Thermo) in die Geltaschen wurde die Elektrophorese mit 100 mA und 100 W gestartet. Hierfür wurden die unter Kapitel 2.1.1 Geräte beschriebenen Spannungsquellen genutzt. Das Programm lief 90 Minuten.

Im zweiten Schritt wurden die Proteine von dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde das Trans-Blot Turbo Blotting System für das Semi-Dry-Blot Verfahren von Bio-Rad verwendet. Bevor die Membran die Proteine aufnehmen konnte, musste diese aktiviert werden. Hierzu wurde sie wenige Sekunden in 100 % Methanol und anschließend in Transferpuffer geschwenkt. Ebenso wurden die aus dem Versuchskit verwendeten Transferstacks im Transferpuffer geschwenkt. Der benutzte Transferpuffer stammt aus dem oben genannten Kit von Bio-Rad. Nun wurde die Kassette gemäß Herstellerprotokoll bestückt und der Blot-Vorgang gestartet. Hierzu wurde das Programm Turbo, wie vom Hersteller vorgegeben, genutzt.

Die auf der PVDF-Membran befindlichen Proteine konnten nun mittels immunologischer Verfahren nachgewiesen werden.

Hierzu wurde die Membran nach dem Blotten ersteinmal eine Stunde mit 5 %-iger Milch geblockt. Anschließend wurde die Membran mit dem Primär-Antikörper (Antikörper gegen das gesuchte Protein) gelöst in Milch über Nacht bei 4 °C oder eine Stunde bei Raumtemperatur in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen rollend inkubiert. Welche Antikörper in welcher Konzentration und mit welcher Lösung diese eingesetzt wurden, können der untenstehenden Tabelle (Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper) entnommen werden.

Der verwendete Waschpuffer (TBS-T) setzt sich folgendermaßen zusammen:

<u>10x Tris-Buffered-Saline (TBS)-Puffer pH 7,6</u>
60,6 g TRIS
87,6 g NaCl
1 M Salzsäure (um den pH-Wert einzustellen)
1 L Aqua dest.

Dieser zehnfache TBS-Puffer wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und ergab dadurch einfachen TBS-Puffer.

Waschpuffer (TBS-T) 1 L 1x TBS-Puffer 1 ml Tween20 Danach wurde die Membran dreimal je zehn Minuten mit TBS-T gewaschen und bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem Sekundär-Antikörper (Antikörper gegen den Primär-Antikörper) inkubiert. Auch hier können die Werte in Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper nachgeschaut werden.

Nach einem weiteren Waschschritt mit dreimal zehn Minuten mit TBS-T wurde, das nach Herstellerangaben vorbereitete, ECL auf der Membran verteilt. Nach einer Einwirkzeit von einer Minute wurde das überschüssige ECL entfernt und die Membran in eine Fotokassette eingelegt. Anschließend wurden von der Membran Röntgenbilder angefertigt.

An den Sekundärantikörper war das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, welche Luminol oxidiert und dadurch eine Chemolumineszenz hervorrufen kann. Diese konnte auf dem entsprechenden Film dargestellt werden. Das erfasste Signal befindet sich ausschließlich an den Orten des Sekundärantikörpers und damit an den Orten der gesuchten Proteine.

Auswertung

Zur Auswertung wurde das Programm Image LAB 4.0.1 genutzt. Grundsätzlich wurde bei der densitrometrischen Auswertung der Quotient aus gesuchtem Protein und zugehörigem β -Actin zur Normalisierung erstellt.

Primäranti-	Firma	Verdünnung und	Blockier-	Herkunftsorga-
körper		Lösungsmittel	lösung	nismus
Mitofusin 1	Abcam,	1/1000 in 5 %-	Milch	mouse
(ab57602)	Cambridge, USA	iger Milch		
Mitofusin 2	CellSignaling,	1/1000 in 5 %-	Milch	rabbit
(D2D10)	Danvers, USA	iger Milch		
OPA-1	Abcam,	1/1000 in 5 %-	Milch	rabbit
(ab42364)	Cambridge, USA	iger Milch		
Fis 1	Sigma,	1/500 in 5 %-iger	Milch	rabbit
(HPA017430)	St. Louis, USA	Milch		
Pink	Abcam,	1/500 in 5 %-iger	Milch	mouse
(ab75487)	Cambridge, USA	Milch		
DRP-1	Abcam,	1/1000 in 5 %-	Milch	mouse
(ab56788)	Cambridge, USA	iger Milch		
HSP60	CellSignaling,	1/1000 in 5 %-	Milch	rabbit
(D6F1)	Danvers, USA	iger Milch		
BLT-1	Abcam,	1/200 in 5 %-iger	Milch	rabbit
(EPR7113)	Cambridge, USA	Milch		
Beta-actin	CellSignaling,	1/2000 in 5 %-	Milch	rabbit
(4967)	Danvers, USA	iger Milch		
anti-rabbit	CellSignaling,	1/2000 in 5 %-iger	Milch	
(7074)	Danvers, USA	Milch		
anti-mouse	CellSignaling,	1/2000 in 5 %-iger	Milch	
(7076)	Danvers, USA	Milch		

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Verwendete Lösungsmittel:

5 %-ige Milch-Lösung

100 ml Waschpuffer

5 g Skim Milk Powder

2.2.7. Statistik

Die Datenerhebung erfolgte mit Microsoft Excel Version 2007 (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland).

Die Analyse der erhobenen Daten wurde mit SigmaStat® Version 3.5 (Systat Software, San Jose, CA USA) durchgeführt.

Die Daten wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Two-Way-ANOVA wurde für die Analyse verschiedener Behandlungsgruppen verwendet. Wenn Gruppen nicht normalverteilt waren, wurde eine Log-Transformation durchgeführt, um sie in eine annähernde Normalverteilung umzuformen. Die Post-hoc-Analyse wurde unter Verwendung des Student-Newman-Keuls-Tests durchgeführt. Wahrscheinlichkeitswerte (p) < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Auswirkung von RvE1 auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine

Um den Einfluss von RvE1 auf die Entstehung proinflammatorischer Zytokine zu untersuchen, haben wir in einem ersten Versuchsansatz die Konzentrationen von Interleukin 6 und 8, beides klassische Zytokine, die für entzündliche Prozesse verantwortlich sind, im Zellkulturüberstand der humanen Alveolarepithelzellen gemessen. Um die entzündlichen Bedingungen experimentiell nachzuahmen, wurden die Zellen mit TNF- α inkubiert, das als Schlüsselzytokin in der Pathogenese der Sepsis angesehen wird. Die Ergebnisse zeigten, dass unter nicht-entzündlichen Bedingungen die Zugabe von RvE1 zum Zellkultursystem keine Veränderungen in der Expression von IL-6 und IL-8 induzierte (Abbildung 2 A + B). Wie erwartet, erhöhte die Inkubation von Zellen mit TNF- α die Sekretion beider Zytokine signifikant (Abbildung 2 A + B, * p < 0,05). Zellen, die nach der Behandlung mit TNF- α mit RvE1 stimuliert wurden, zeigten signifikant reduzierte IL-6- und IL-8-Spiegel im Vergleich zu den jeweiligen TNF-behandelten Gruppen (Abbildung 2 A + B, § p < 0,05).



Abbildung 2: Produktion von Interleukin 6 (A) und Interleukin 8 (B) nach Zugabe von TNF- α und nach Zugabe von TNF- α und Resolvin E1 im Vergleich zu der Kontrollgruppe und alleiniger Zugabe von Resolvin E1. Deutlich erkennbar die verminderte Produktion beider Interleukine nach Zugabe von Resolvin E1 bei simultierter Entzündung.

3.2. Einfluss von RvE1 auf die Expression von Zellstress- und Apoptoseassoziierten Proteinen

Nach Identifizierung einer entzündungshemmenden Wirkung von RvE1 auf menschliche Alveolarepithelzellen versuchten wir, die Expression von Zellstress- und Apoptoseverwandten Proteinen in entsprechenden Zelllysaten zu analysieren. Im Allgemeinen zeigten die Ergebnisse der Proteinarrays geringe Veränderungen in der Expression von Stress- und Apoptose-verwandten Proteinen nach RvE1- oder TNF- α -Behandlung in menschlichen Alveolarepithelzellen.

In Bezug auf Zellstress-assoziierte Proteine konnten wir eine diskrete Hochregulation von p38 α [A], HSP60 [B], PON2 [C], COX-2 [D], SIRT2 [E], SOD2 [F], und p21 [G] in Zellen, die TNF- α ausgesetzt waren, im Vergleich zu Kontrollen beobachten (Abbildung 3 oben). Interessanterweise zeigten Zellen, die nach TNF- α -Exposition mit RvE1 inkubiert wurden, eine reduzierte Expression der oben erwähnten Proteine und wiesen somit ein Expressionsprofil auf, das mit Kontrollzellen übereinstimmt.

In unserer experimentellen Umgebung zeigte die Expression von Apoptose-verwandten Proteinen auch nur diskrete Veränderungen bei RvE1- oder TNF-α-Behandlung (Abbildung 3).

Nach TNF-α-Exposition konnte eine diskrete Hochregulation des pro-apoptotischen TRAIL R2 [A] nachgewiesen werden, die sich bei Behandlung mit RvE1 unter entzündlichen Bedingungen reduziert (Abbildung 3 unten). Eine densitometrische Analyse der oben genannten relevanten Stress- und Apoptose-verwandten Proteine ist in Abbildung 3 dargestellt.

3.3. Analyse von RvE1-Rezeptoren

Als nächstes wurde untersucht, ob die beobachteten entzündungshemmenden Wirkungen von RvE1 durch seinen Rezeptor ChemR23 vermittelt wurden. Die ChemR23-Expression war sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in A549-Zellen nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Da die Wirkung von RvE1 möglicherweise auch durch den Leukotrien-B4-Rezeptor BLT-1 vermittelt wird, wurde als Nächstes die Expression von BLT-1 in A549-Zellen untersucht und es konnte eine stabile Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden, die nicht durch die Behandlung mit RvE1 und / oder TNF- α beeinflusst wurde. Um die Funktionalität von BLT-1 in A549 zu untersuchen, wurde in diesem experimentellen Ansatz den BLT-1-Antagonisten CP-105696 verwendet. Wie oben gezeigt, induzierte RvE1 unter entzündlichen Bedingungen eine signifikant verringerte Sekretion von IL-6 (Abbildung 4, * p < 0,05). Die Blockierung von BLT-1 mit CP-105696 vor der Zugabe von RvE1 zeigte ähnliche IL-6-Spiegel im Vergleich zu RvE1, die auch im Vergleich zu TNF- α allein signifikant waren (Abbildung 4, # p < 0,05). Interessanterweise zeigten Zellen, die einer Behandlung mit CP-105696 unterzogen wurden, signifikant niedrigere IL-6-Konzentrationen im Zellkulturüberstand im Vergleich zu TNF- α allein (Abblidung 4, § p < 0,05).



Abbildung 3: Einfluss von TNF-α und Resolvin E1 auf die Expression verschiedener Cell stress (oben) und Apoptose (unten) –Proteine. In den Kästchen markiert sind: p38α [A], HSP60 [B], PON2 [C], COX-2 [D], SIRT2 [E], SOD2 [F], and p21 [G].



Abbildung 4: Auswirkungen der Blockierung des BLT-1-Rezeptors mit CP-105696 unter Zugabe von TNF- α und Resolvin E1 jeweils im Vergleich ohne Blockierung des Rezeptors Die IL-6 Spiegel waren nicht nur unter dem Einfluss von Resolvin E1 signifikant geringer (* p < 0,05), sondern auch nach Blockeirung des BLT-1-Rezeptors im Vergleich zur Inkubation mit TNF- α (§ p < 0,05). Dagegen zeigten sich keine Unterschiede der Wirkung von Resolvin E1 mit oder ohne Blockade des BLT-1-Rezeptors (#).

3.4. Veränderung der Zellatmung unter dem Einfluss von Resolvin E1

Zunächst wurde der Einfluss von RvE1 auf die mitochondriale Atmung durch *highresolutin respirometry* untersucht, die als Schlüsselmerkmal der mitochondrialen Funktion gilt. Die Inkubation humaner Alveolarepithelzellen mit RvE1 oder TNF- α induzierte keine signifikante Veränderung der Routineatmung verglichen mit unbehandelten Zellen. Die Atmung der Mitochondrien, die nach Hemmung der ATPase mit Oligomycin gemessen wurde (Leak, Abbildung 5), spiegelt die intrinsische Entkopplung wider und war über alle Behandlungsgruppen konsistent. Interessanterweise zeigten die mit TNF- α behandelten Zellen eine signifikant reduzierte maximale Atmungskapazität pro Zelle (Abbildung 5, Max), gemessen nach Entkoppeln mit FCCP, im Vergleich zu allen anderen Gruppen (Abbildung 5, * p < 0,05). Diese beeinträchtigte maximale Atmungskapazität nach Exposition gegenüber TNF- α konnte durch Zugabe von RvE1 vollständig wiederhergestellt werden (Abbildung 5, # p < 0,05). Die Atmung nach Inhibition durch Antimycin A zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsschemata (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 5: Veränderungen der Zellatmung unter experimenteller Entzündung und der Zugabe von Resolvin E1. Unter inflammatorischen Bedingungen war die maximale Zellatmung signifikant geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe (* p < 0,05), welche jedoch durch Resolvin E1 wiederhergestellt werden konnte (# p < 0,05)

3.5. Bestimmung der Kopienzahl mitochondrialer DNA

Um zu untersuchen, ob die oben genannten Veränderungen der Atmungskapazität durch eine Veränderung der mitochondrialen Dichte beeinflusst wurden, wurde ein quantitativer PCR-Ansatz gewählt, der die Kopienzahl der mitochondrialen DNA (mtDNA) mit der nukleären DNA (nDNA) in Beziehung setzt. Es konnten keine signifikanten Veränderungen im mtDNA-Gehalt zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen festgestellt werden (Abbildung 6).



Abbildung 6: Es wurden keine signifikanten Veränderungen des Gehaltes an mtDNA unter der Einwirkung von Resolvin E1 festgestellt.

3.6. Veränderungen in der Expression von "fission and fusion"-Genen und -Proteinen

Um zu klären, ob die gestörte TNF- α -assoziierte mitochondriale Dysfunktion mit Veränderungen von *mitochondrial fission and fusion* in humanen Alveolarepithelzellen assoziert sind, wurden die mRNA-Expressionen diesbezüglich relevanter Gene untersucht. In Bezug auf die *fission*-regulierenden Gene *FIS-1* und *DRP-1* konnten wir eine signifikant verminderte Expression von *FIS-1* nach Zugabe von RvE1 bei Stimulation mit TNF- α im Vergleich zu den nur mit TNF- α behandelten Zellen (Abbildung 7 (A); * p < 0,05) nachweisen. Für *DRP-1* konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 7 (B)).

Analysen der Fusions-assoziierten Gene *MFN1*, *MFN2* und *OPA-1* zeigten, dass die Zugabe von RvE1 unter inflammatorischen Bedingungen eine signifikant erhöhte *MFN1*-mRNA-Expression im Vergleich zu TNF- α oder Kontrollen zeigte (Abbildung 7 (C); * p < 0,05). In unserem experimentellen Setting wurden keine signifikanten Unterschiede für *MFN2* und *OPA-1* beobachtet (Abbildung 7 (D+E)).

Nachfolgend wurde die Proteinexpression von *FIS-1* und *MFN1* durch Western Blotting untersucht, da beide signifikante Veränderungen hinsichtlich der Gendarstellung in un-

serem experimentellen Setting zeigten. Es konnte eine signifikante Herunterregulierung des mitochondrialen Fusion-assoziierten *MFN1* nach Stimulation von Zellen mit TNF- α im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen nachgewiesen werden, die nach Inkubation mit RvE1 nicht vorhanden war (Abbildung 9 (B); *, p < 0,05). Für *FIS-1* konnten keine relevanten Veränderungen der Proteinexpression nachgewiesen werden (Abbildung 9 (A)).



Abbildung 7: Veränderungen der Proteinexpression von Fission und Fusion-Proteinen unter dem Einfluss von Resolvin E1

(A) Verminderte Expression von Fis-1 nach Zugabe von RvE1 bei induzierter Inflammation (* p < 0,05); (C) Vermehrte Expression von MFN-1 nach Zugabe von RvE1 bei induzierter Inflammation (* p < 0,05); Die Expressionen von DNM (B), MFN-2 (D) und OPA-1 (E) blieben unverändert.

49



Abbildung 8: Banden der Proteine FIS-1 und MFN-1 im Westernblot im Vergleich zu beta-actin (housekeeping gen)



Abbildung 9: Verhältnis von FIS-1 (A) und MFN-1 (B) jeweils zu beta-actin (housekeeping gen) Während bei der Expression von FIS-1 keine Veränderungen auftraten konnten bei MFN-1 signifikant geringere Proteinexpressionen nachgewiesen werden * p < 0.05

3.7. Einfluss von mitochondrial fission and fusion auf die Inflammation

Da TNF- α -assoziierte Veränderungen der *mitochondrial fission and fusion* in humanen Alveolarepithelzellen beobachtet werden konnte, die durch Zugabe von RvE1 modifiziert werden konnten, wurde als nächstes der Einfluss der mitochondrialen *fission*-Reaktionen auf die Bildung proinflammatorischer Zytokine analysiert. Für diese Experimente wurden die mitochondrialen *fission*-Inhibitoren Mdivi-1 und Dynasore verwendet, die vor der Stimulation mit TNF- α dem Zellkultursystem zugesetzt wurden.

Wie oben gezeigt, induzierte die Inkubation von menschlichen Alveolarepithelzellen mit TNF- α signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-6 und IL-8 im Zellkulturüberstand (Abbildung 10; *, p < 0,05). Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, dass die Vor-

inkubation von menschlichen Alveolarepithelzellen mit Mdivi-1 vor der Induktion der experimentellen Entzündung die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 im Vergleich zu den Spiegeln in den Überständen von allein mit TNF- α behandelten Zellen signifikant reduzierte (Abbildung 10; §, p < 0,05). Unter nichtentzündlichen Bedingungen veränderte Mdivi-1 die IL-6- oder IL-8-Spiegel im Vergleich zu den Kontrollen nicht.

Die Vorinkubation mit Dynasore hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung der entzündungsfördernden Zytokine sowohl unter entzündlichen als auch nichtentzündlichen Bedingungen.



Abbildung 10: Einfluss von Mdivi und Dynasore auf die Bildung proinflammatorischer Zytokine IL-6 (A) und Il-8 (B) [pg/ml]

Unter inflammatorischen Bedingungen zeigten sich die IL-6- und die IL-8-Spiegel erhöht (* p<0,05), Unter dem zusätzlichen Einfluss von Mdivi war die Ausschüttung beider Zytokine signifikant vermindert (§ p<0,05). Dynasore hatte keinen Einfluss auf die Interleukine.

3.8. Veränderung der Zellatmung unter dem Einfluss von Mdivi-1 und Dynasore Anschließend untersuchten wir den Einfluss von Mdivi-1 auf die mitochondriale Atmung durch *high-resolution respirometry*. Wie in den oben erwähnten Experimenten beobachtet, wurden keine signifikanten Veränderungen in der Routineatmung zwischen den Kontrollen und den mit TNF- α -behandelten Zellen nachgewiesen. Interessanterweise induzierten Mdivi-1 allein sowie die Vorbehandlung von Zellen mit Mdivi-1 vor der Induktion einer Entzündung durch TNF- α eine signifikant erhöhte Routineatmung im Vergleich zu menschlichen Alveolarepithelzellen, die nur TNF- α unterzogen wurden (Abbildung 11; * p < 0,05). Die nach Hemmung der ATPase mit Oligomycin gemessene Mitochondrienatmung zeigte signifikant erhöhte Werte für mit Mdivi-1 und TNF- α

behandelte Proben im Vergleich zu alleiniger TNF- α -Behandlung (Abbildung 11; §, p < 0,05). Im Hinblick auf die Analyse der maximalen Atmungskapazität zeigten Zellen, die einer Behandlung mit TNF- α unterzogen wurden, eine signifikant verminderte Atmungskapazität im Vergleich zu den Kontrollen, sowie den Zellen, die mit Mdivi-1 allein behandelt wurden, was mit den oben beschriebenen Befunden übereinstimmt (Abbildung 11; #, p < 0,05). Bemerkenswert ist, dass die Vorbehandlung von Zellen mit Mdivi-1 vor der Induktion einer Entzündung durch Stimulation mit TNF- α die beeinträchtigte maximale Atemkapazität nach Exposition gegenüber TNF- α signifikant wiederherstellte (Abbildung 11; *, p < 0,05). Die Atmung nach Inhibition durch Antimycin A zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungs-schemata (Daten nicht gezeigt).

Dynasore konnte dagegen keinen dieser Effekte auslösen, weder zeigte sich eine Veränderung in der Routineatmung, noch ein positiver Effekt in der maximalen Atmungskapazität in Anwesenheit von TNF- α . Dynasore zeigte in der maximalen Atmung nach Stimulation mit FCCP einen negativen Effekt, so erreichten diese Werte nicht das Niveau der maximalen Atmung von der Kontrollgruppe oder der Stimulation mit Mdivi-1.

Durch Bestimmung des mitochondrialen DNA-Gehalts im Verhältnis zur genomischen DNA in der oben erwähnten Versuchsanordnung konnten Veränderungen der mitochondrialen Dichte ausgeschlossen werden, die für die oben erwähnten Veränderungen der Atmungskapazität verantwortlich sein könnten (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 11: Veränderung der Zellatmung unter dem Einfluss von Mdivi und Dynasore Die Inkubation der A549-Zellen mit Mdivi allein zeigte im Vergleich zu der Inkubation der Zellen mit Mdivi und TNF- α eine signifikant erhöhte Routineatmung * p< 0,05;

4. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Resolvin E1 auf die pulmonale Inflammation zu untersuchen. Als Versuchsansatz diente die Induktion einer experimentellen TNF- α -vermittelten Entzündungsreaktion einer humanen Alveolarepithelzelllinie.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Entzündungsreaktion mit einer gestörten Funktion der Mitochondrien einherging, welche durch die mitochondriale Atmung sowie durch die Bildung entzündungsbedingter Zytokine und Zellstressproteine in diesen Zellen bestimmt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von RvE1 diese TNF- α -induzierte mitochondriale Dysfunktion vollständig wiederherstellen und die proinflammatorische Antwortreaktion reduzieren konnte. Die mitochondriale Dysfunktion, die wahrscheinlich durch erhöhte mitochondriale *fission*-Reaktionen ausgelöst wird, kann durch RvE1 und den mitochondrialen *fission*-Inhibitor Mdivi-1 therapeutisch adressiert werden, wodurch die mitochondriale Dysfunktion aufgehoben und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine gehemmt werden kann.

4.1. Auswirkungen von Inflammation auf die Lungenzelle

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, liegt die häufigste Ursache einer Sepsis in der Pneumonie [39]. Gleichzeitig können weitere Erkrankungen der Lunge, wie zum Beispiel das akute Lungenversagen (ARDS), den Verlauf der Sepsis verkomplizieren [64]. Vor diesem Hintergrund wurde eine humane Alveolarepithelzelllinie verwendet, da die Schädigung und Zerstörung der Alveolarepithel-Integrität und damit der Verlust der Barrierefunktion ein charakteristisches Merkmal dieser Lungenschädigung ist und gleichzeitig pulmonale Infektionen fördert [59, 89]. Die verwendeten Zellen wurden mit TNF- α stimuliert, welches eine zentrale Schlüsselrolle in der Pathogenese von Entzündungen und der Sepsis spielt [81, 110].

Wie zu erwarten erhöhte die Inkubation der Zellen mit TNF- α die Produktion der proinflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8 signifikant. Gleichzeitig konnte eine diskrete Mehrexpression von Proteinen, wie p38 α , HSP60, PON2 oder COX-2 nach Zugabe von TNF- α beobachtet werden (siehe Kapitel 3.2), welche in Signalkaskaden von Entzündungen und oxidativem Zellstress eine Rolle spielen [30, 48, 130].

4.2. Einfluss von RvE1 auf die pulmonale Entzündungsreaktion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass RvE1 die inflammatorischen Effekte (siehe Kapitel 4.1) mindern oder zum Teil wieder aufheben konnte. So zeigte sich, dass die proinflammatorischen Interleukine IL6 und IL8 in deutlich geringerer Menge ausgeschüttet wurden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass RvE1 das inflammatorische Bild der Ergebnisse des Zellstress- und des Apoptose-Arrays abschwächte und somit einen Hinweis auf Gegenregulation bietet und zum Teil in der Lage war die Ausgangssituation wiederherzustellen (siehe Kapitel 3.2).

Die entzündungshemmenden und -auflösenden Effekte von RvE1 wurden bereits in zahlreichen Studien beschrieben, unter anderem in einem murinen Modell des säureinduzierten ARDS [11, 76, 114]. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen verringerte die intravenöse Verabreichung von RvE1 vor einer Säureverletzung der Lunge die Lungengewebespiegel mehrerer entzündungsfördernder Chemokine und Zytokine signifikant, was zu einer deutlichen Verbesserung des Überlebens führte [114].

Bisher können die Entzündungs-auflösenden Effekte des EPA-Derivats auf folgende Mechanismen zurückgeführt werden. 1) regulatorische Beeinflussung der Leukozytenfunktionen, 2) vermehrte phagozytische Clearance von apoptotischen Neutrophilen, 3) phänotypische Umschaltung von Makrophagen und 4) Modulation des Trafficking und der proinflammatorischen Mediatorfreisetzung [28, 105, 136]. RvE1 interagiert dabei mit verschiedenen Signalmolekülen, welche auch in der Pathogenese der Sepsis eine große Rolle spielen [49, 136].

RvE1 entfaltet nach heutigen Kenntnissen seine Wirkung vor allem über zwei Rezeptoren, ChemR23 (oder CMKLR1) und BLT1 [9, 10, 118, 136].

Zum einen kann RvE1 als Agonist durch Bindung an ChemR23 dienen, um die TNF- α induzierte Aktivierung von NF- κ B in einer konzentrationsabhängigen Weise zu blockieren [9]. RvE1 kann aber auch die proinflammatorische LTB4-vermittelte BLT-1-Signalgebung durch verminderte Aktivierung von NF- κ B abschwächen [10]. In Mäusen, die einer Dextransulfat-Natrium-induzierten Kolitis ausgesetzt waren, inhibierte RvE1 deutlich die Phosphorylierung von NF- κ B und reduzierte die Mengen proinflammatorischer Mediatoren [69]. Die Arbeitsgruppe um H. Seki konnte in einem Mausmodell zur bakteriellen Pneumonie zeigen, dass RvE1 die Translokation und Aktivierung von NF-κB (p65) in Lungengewebshomogenaten hemmt und die bakterielle Clearance verbessert [114].

Weitere Moleküle zur Beeinflussung von Signaltransduktionswegen sind die PI3K und die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK) der mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Familie. Dies sind Signalmoleküle, welche im weiteren Verlauf der Signalkaskade die Serin/Threonin-Kinase Proteinkinase B (Akt) beeinflussen, was wiederum zu entzündlichen Reaktionen führen und das apoptotische Verhalten von Zellen beeinflussen kann [136]. Interaktionen von RvE1 mit dem BLT-1-Rezeptor führen zu einer Aktivierung von PI3K, die wiederum eine Phophorylierung von Akt hervorruft und damit eine Phosphorylierung von ERK initialisiert [98]. So konnten Keyes und Kollegen zeigen, dass durch eine vermehrte Phophorylierung von Akt, ERK und endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) bei gleichzeitiger Minderung der Konzentrationen von aktivierter pro-apoptotischer Caspase 3 und p38-mitogen-activated-protein-Kinase (p38) [76] eine direkte Schutzwirkung auf Kardiomyozyten, die einer Hypoxie ausgesetzt waren, ausgeübt wurde [76]. Dies geschah zum einen indem RvE1 apoptotische Programme in den Zellen regulierte, zum anderen reduzierte RvE1 den neutrophilen Einstrom in das Infarktgebiet [76]. So konnte gezeigt werden, dass RvE1 die Infarktgröße bei Rattenherzen begrenzen kann [76].

Überraschenderweise war es in diesem Experiment nicht möglich, ChemR23 in A549-Zellen nachzuweisen, es konnte jedoch eine robuste Expression von BLT-1 gezeigt werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde bislang von Woo et al. beschrieben [146]. Mit dem BLT-1-Antagonisten CP-105696 konnte seine Funktionalität demonstriert werden, dies hatte aber keinen direkten Einfluss auf die durch RvE1 vermittelten entzündungshemmenden Eigenschaften. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass RvE1 in A549 seine Funktion auf eine von ChemR23 und BLT-1 unabhängige Weise ausüben könnte. Die Identifizierung der möglichen neuartigen RvE1-Bindungspartner liegt au-Berhalb des Rahmens unserer Studie.

4.3. Veränderungen in der Zellatmung

Hinsichtlich der Analyse der mitochondrialen Atmung konnte in dieser Arbeit ein signifikanter TNF-α-induzierter Rückgang der maximalen Atemkapazität der Mitochondrien festgestellt werden. Unsere und auch weitere Arbeitsgruppen konnten in verschiedenen Geweben und Zelltypen zeigen, dass Entzündung Einfluss auf die mitochondriale Funktion nehmen kann und die mitochondriale Atmungskapazität reduziert [26, 62, 63, 125]. RvE1 war in der Lage, diese verminderte maximale Atmungskapazität unter TNF-α vollständig wiederherzustellen. Dabei veränderte RvE1 jedoch nicht die beiden anderen Parameter Routine- und LEAK-Atmung. Dies ist ein Hinweis, dass RvE1 lediglich den Folgen der Entzündung entgegen steht, ohne in das funktionierende physiologische System einzugreifen.

Die maximale Atmungskapazität kann als Maß für die mitochondriale respiratorische Reserve angesehen werden. Die eingeschränkte Leistungsfähigkeit der Mitochondrien geht somit mit einer eingeschränkten Möglichkeit zur ATP-Produktion einher, was zum bioenergetischen Versagen der Zellen führen kann [17, 55, 129]. So konnten Brealey et al durch Muskelbiopsien von 28 an Sepsis erkrankten Patienten zeigen, dass diejenigen, welche die Sepsis nicht überlebten signifkant geringere ATP-Spiegel aufwiesen [19].

Der Rückgang der mitochondrialen Atmung unter inflammatorischen Bedingungen kann durch eine Hemmung der mitochondrialen Komplexaktivität verursacht werden. Durch TNF- α wird das Spingholipid Ceramid produziert, welches unter anderem Lipidperoxidationen verursacht und zu einem Aktivitätsverlust der Cytochrom-c-Oxidase führt [50]. Die genannten Veränderungen führen zur Bildung von ROS [50]. ROS sind für viele physiologische Zellvorgänge essentiell und normalerweise von einen antioxidativen Netzwerk kontrolliert [73]. Im Rahmen von Entzündungen kann diese Feinregulierung gestört werden und es kommt zu einer übermäßigen, schädigenden ROS-Produktion, welche durch einen sogenannten Permeabilitätsübergang der Mitochondrien zur Apoptose der Zelle führen kann [49]. Aufgrund der Vielzahl von Funktionen von Mitochondrien (neben den genannten, unter anderem auch Regulierung des Calciumhaushaltes, Teilnahme an intrazellulären Signalkaskaden, Codierung von Polypeptiden und Transfer-DNA, Zitronensäurezyklus, β -Oxidation von Fettsäuren, Biosynthese von Häm und bestimmten Phospholipiden) kann eine Schädigung durch Inflammation den klinischen Verlauf von schwerer Entzündung und Sepsis negativ be-

einflussen [49, 110, 144]. So gibt es Studien, die in der Sepsis reduzierte ATP-Konzentrationen und eine Hemmung der Atmungskette in verschiedenen Geweben nachweisen konnten [19, 52, 83].

Eine weitere Studie unserer Arbeitsgruppe mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMCs) konnte die negative Auswirkungen von Entzündung, insbesondere auf Zellatmung, nachweisen. Sie ist bisher die einzige weitere veröffentlichte Untersuchung, welche die Normalisisierung der maximalen mitochondrialen Atmungskapazität durch RvE1 in PBMCs zeigen konnte [61].

Durch Vergleiche der mitochondrialen DNA mit nukleärer DNA (gemessen an GAPDH) konnte ein unterschiedlicher Mitochondriengehalt als Ursache für die Veränderungen ausgeschlossen werden, was darauf hinweist, dass durch das entzündliche Geschehen dieses Experimentes die mitochondriale Funktion beinträchtigt wird.

4.4. Mitochondriale Dysfunktion durch Veränderung der mitochondrialen Morphologie

Mitochondrien sind dynamische Organellen, die ständig miteinander verschmelzen und sich teilen. Diese Prozesse sind unter anderem wichtig für die mitochondriale Vererbung und für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktionen [144]. Gleichzeitig ist diese mitochondriale Dynamik auch ein zentraler Bestandteil für (physiologischen) programmierten Zelluntergang [144].

Verschiedene Studien belegen den Zusammenhang zwischen einer Dysbalance dieser mitochondrialen Dynamik und zahlreichen Erkrankungen. So fanden Knott et al. Hinweise auf Interaktionen von mutierten Proteinen, wie sie bei Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Chorea Huntington auftreten, mit Proteinen der Spaltungs- und Fusionsmaschinerie [77]. Weitere Studien konnten Mutationen in *mitochondrial fusion* -Proteinen bei Optikusatrophie [24, 33], eine gestörte mitochondriale Dynamik bei renalen Erkrankungen [155], Assoziationen zwischen Diabetes mellitus Typ 2 und mitochondrialer Dysfunktion [151] sowie veringerte Expression von mitochondrial fu-

Schon lange ist bekannt, dass Entzündung zur Produktion von ROS führt [91], vor allem in der gravierendsten Form von Entzündung, der Sepsis [49, 57]. ROS sind nicht nur ein

Produkt von Mitochondrien, sondern auch ein mitochondrienschädigendes Agens und führen somit, neben anderen Faktoren, zu mitochondrialer Dysfunktion. Diese Dysfunktion konnten wir in Form von eingeschränkter respiratorischer Kapazität in unserem Experiment nachweisen (siehe 3.4 und 4.3). Des Weiteren konnten bereits weitere Studien mitochondriale Dysfunktion mit Sepsis in Verbindung bringen [13, 19, 20, 32, 53]. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in PBMCs und mit dieser Arbeit in A549-Zellen nachweisen, dass die Auswirkungen der inflammatorischen mitochondrialen Dysfunktion, durch RvE1 vollständig wiederhergestellt werden konnte [61].

Dieser Effekt lässt sich ebenfalls auf der Ebene der Genexpression beobachten. So konnte gezeigt werden, dass RvE1 unter entzündlichen Bedingungen die Fis-1-Expression, die eine der am besten untersuchten Komponenten der *mitochondrial fission* - Reaktionen ist, reduziert. Fis-1 (*Mitochondrial fission 1*) ist ein Membranrezeptor auf der äußeren Membran von Mitochondrien, der für die Rekrutierung von DRP1 oder DLP1 (*Dynamin related protein 1*) zuständig ist. Gleichzeitig beeinflusst RvE1 die mitochondriale Fusion durch verstärkte Genexpression von MFN1. Auf Proteinebene wirkt RvE1 der TNF- α -induzierten verminderten Produktion von MFN1 entgegen und fördert so Fusionsprozesse. Resolvin greift so in die morphologischen Veränderungen der Mitochondrien ein.

Diese Befunde könnten von Interesse sein, da es zunehmend Belege für eine zentrale Rolle von *mitochondrial fission and fusion* als Schlüssel zur Reparatur von geschädigten mitochondriellen Komponenten gibt. Der Zusammenschluss von Mitochondrien miteinander dient vor allem dem Austausch von Komponenten zwischen geschädigten und nichtgeschädigten Mitochondrien (Netzwerkbildung) [8, 23, 96]. Darüber hinaus ist das Verschmelzen zweier benachbarter Mitochondrien ein entscheidender Prozess, der den Austausch von Metaboliten ermöglicht, um die Integrität der Mitochondrien und eine ausreichende Energieversorgung sicherzustellen [108]. Auf der anderen Seite haben die Mitochondrien die Möglichkeit über *fission*-Reaktionen geschädigte Arreale abzutrennen [135]. Diese Entlastung geschädigter Areale dient somit die Integrität des gesamten Netzwerkes von Mitochondrien aufrechtzuerhalten [56].

Aufgrund neuartiger Einblicke in die morphologische mitochondriale Dynamik wurde deutlich, dass sich Mitochondrien schnell an zelluläre bioenergetische Anforderungen, Energieaufwand oder Zellstress, wie schwere Entzündungen, anpassen können, um zelluläre Homöostase zu erhalten [144].

Zusammenfassend greift RvE1 in die Signaltransduktion von Entzündungen ein, um diese zu regulieren und zu beenden und zeigt somit antiinflammatorische Effekte. Gleichzeitig wurden in mehreren Studien aktive entzündungsauflösende Wirkungen von RvE1 beschrieben [28, 105, 136]. Ein weiterer Weg, das Entzündungsgeschehen positiv zu beeinflussen könnte die Wirkung des RvE1 auf die mitochondriale Morphologie sein. Wir haben daher den Einfluss von *mitochondrial fission and fusion* auf Entzündung in humanem Alveolarepithel unter experimentellen Bedingungen untersucht. Hierzu verwendeten wir die zwei bisher am besten untersuchten Spaltungsinhibitoren Mdivi-1 und Dynasore.

4.5. Möglicher Therapeutischer Ansatz durch Mdivi-1 und Dynasore

Da wir bereits einen Einfluss von RvE1 auf Gene und Proteine der *mitochondrial fission and fusion* erkennen konnten, untersuchten wir den Einfluss mitochondrialer Dysfunktion auf entzündliche Vorgänge in humanen Alveolarzellen. Wie bereits erwähnt wurden in dieser Studie die Spaltungsinhibitoren Mdivi-1 und Dynasore verwendet.

Dynasore inhibiert die GTP-Hydrolyse von Dynamin-1, Dynamin-2 und DRP1 in nichtkompetitiver Weise durch Bindung an die GTPase-Domäne [85].

Im Gegensatz zu Dynasore reduzierte die Inkubation humaner Alveolarepithelzellen mit Mdivi-1 die TNF-α-induzierte Bildung proinflammatorischer Zytokine signifikant. Darüber hinaus stellte Mdivi-1 die beeinträchtigte mitochondriale Atmung unter experimenteller Entzündung vollständig wieder her.

Bis auf die Tatsache, dass Entzündung und oxidativer Stress zu einer Fragmentierung von Mitochondrien führen um den Abbau der schwer geschädigten Organellen zu erleichtern, ist bisher wenig über die Rolle von *mitochondrial fission* während inflammatorischen Geschehens bekannt [46, 154].

Verschiedene Studien belegen den Zusammenhang zwischen der chronisch entzündlichen Lungenerkrankung und mitochondrialer Dysfunktion [145, 153], jedoch ist dies, nach besten Wissen, die erste Studie die diesen Zusammenhang unter experimenteller Entzündung in humanen Alveolarepithelzellen untersucht. Park und Kollegen konnten in murinen Mikrogliazellen zeigen, dass die Hemmung der LPS-induzierten mitochondrial fission und die Bildung von ROS durch Mdivi-1, die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren über Reduktion von NF-KB und mitogenaktivierter Proteinkinase (MAPK)-Signalgebung verringert [101]. Fan et al. demonstrierten kürzlich, dass Mdivi-1 eine frühe Hirnschädigung nach experimenteller Subarachnoidalblutung, vermutlich durch Unterdrückung der entzündungsbedingten Störung der Blut-Hirn-Schranke, abschwächte [43]. Weitere Studien belegen den Zusammenhang zwischen Entzündung und einer gestörten mitochondrialen Dynamik für entzündungsinduzierte Knochenzerstörung [156], Inflammasomaktivierung [157] und Efferozytose [142]. Basierend auf diesen und unseren Daten, könnte die Modifikation von mitochondrial fission and fusion mit dem Ziel, die Integrität und Homöostase der Mitochondrien wiederherzustellen, als neuer therapeutischer Ansatz für die Behandlung von entzündlichen Erkrankungen in Zukunft in Frage kommen. Ferner konnten Islam et al. und Spees et al. auf anderem Wege zeigen, dass die Wiederherstellung des mitochondrialen Potentials einer Zelle deren Überleben verbessert [70, 126]. Eine vor Kurzem veröffentlichte Studie konnte dies auf Modelle von Atemwegsverletzungen und Entzündungen übertragen [3]. Des Weiteren konnten die Kollegen um Gonzalez positive Effekte auf die mitochondriale Dynamik durch die Gabe von Mdivi-1 vor Induktion einer Sepsis durch cecal ligation and punction, nachweisen [56]. In dieser Studie konnte nicht nur eine Minderung der mitochondrialen Dysfunktion beobachtet warden, sondern damit einhergehend auch ein verminderter Zelluntergang durch Apoptose [56].

Ein bemerkenswerter Befund der vorliegenden Studie ist die unterschiedliche Wirkungsweise von Mdivi-1, das entzündungshemmende Eigenschaften hat, und Dynasore, das in unserer Versuchsanordnung keine Auswirkungen auf die Bildung von Entzündungsmediatoren oder die Atmung der Mitochondrien zeigte. Hecker et al. haben kürzlich in einem Modell experimenteller Entzündungen gezeigt, dass beide Inhibitoren in menschlichen PBMC ähnliche entzündungshemmende Wirkungen induzieren [61]. Neben einer weiteren Studie zur Untersuchung von Mitochondrien und Endothelin-1induzierter Arterienkonstriktion [22], konnten wir in der Literatur keine weiteren direkten Vergleiche dieser beiden Inhibitoren finden. Als mögliche Erklärung für die beobachteten unterschiedlichen Effekte der beiden Inhibitoren nehmen wir neben einem zelltypspezifischen Phänomen an, dass Mdivi-1 selektiver zu sein scheint als Dynasore. Dieser Aspekt wird durch die Tatsache gestützt, dass Dynasore die GTP-Hydrolyse von Dynamin-1, Dynamin-2 und DRP1 auf nicht-kompetitive Weise durch Bindung an die GTPase-Domäne inhibiert, wohingegen Mdivi-1 selektiv die Aktivität von DRPs der mitochondrialen Teilung hemmt, indem es an eine allosterische Stelle bindet [85, 133].

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend haben wir in der vorliegenden Studie gezeigt, dass RvE1 entzündungshemmende Eigenschaften in menschlichen Alveolarepithelzellen besitzt. Unter experimenteller Entzündung zeigte sich eine gesteigerte Produktion von proinflammatorischen Interleukinen, sowie eine gestörte mitochondriale Atmung und spiegelte somit eine schwere Einschränkung der mitochondrialen Funktion wider. RvE1 konnte diese Folgen entzündlicher Aktivität für Mitochondrien vollständig wiederherstellen und die Bildung proinflammatorischer Faktoren herabregulieren.

Auf Ebene der Proteine konnten wir Veränderungen in der mitochondrialen Dynamik dokumentieren. Auch hier zeigte RvE1, dass es die Auswirkungen der Entzündung rückgängig machen kann. Der Eingriff in die Regulation der Morphologie der Mitochondrien könnte einer der Mechanismen sein, welche die entzündungshemmende und krankheitsmodifizierende Wirkung von RvE1 erklärt. Ein weiterer Hinweis hierauf lieferten die Ergebnisse aus den Experimenten mit Mdivi-1. Die Verhinderung von *fission* der Mitochondrien konnte ganz ähnliche Ergebnisse erzielen, wie zuvor RvE1. Die Funktionen von *mitochondrial fission and fusion* scheinen eng mit der Pathogenese von Entzündungsvorgängen in Lungenzellen verknüpft zu sein. Inwieweit die Manipulation der mitochondrialen Dynamik in Zukunft zu neuen, nicht-antibiotischen Therapieansätzen für Lungeninfektionen führen könnte, müssen weiter Experimente zeigen.

Interresanterweise konnten wir weder den, für RvE1 bekannten, ChemR23-Rezeptor in A549-Zellen, noch einen Zusammenhang zwischen BLT-1 und der antiinflammatorischen Wirkung von RvE1 nachweisen. Weitere Studien könnten neue Interaktionspunkte von RvE1 aufdecken.

6. Summary

In summary, in the present study we have shown that RvE1 has antiinflammatory properties in human alveolar cells.

There was a greater production of proinflammatory interleucins and a disturbed mitochondrial respiration in experimental inflammatory. This shows the severe restriction of the mitochondrial function. We show that RvE1 totally restores the conesequences of inflammation and downregulates the proinflammatory interleukins.

RvE1 also interacts with proteins, especially in our setting with the proteins for fission and fusion. RvE1 countermand the effects of our experimental inflammation.

The interaction of RvE1 with the fission and fusion machinery might be one of the mechanisms explaining the anti-inflammatory and disease-modifying effect of RvE1.

This statement is supported by the results of our experiments with Mdivi which delivers similar results by blocking the fission of mitochondria.

Furthermore our results indicate an association between the fission and fusion machinery and the pathogenesis of inflammation of pulmonary cells, which may lead to novel non-antibiotic-based therapeutic approaches for pulmonary infections in the future. This will be the task of further studies.

Interestingly, we were unable to detect either the RVE1-known ChemR23 receptor in A549 cells, nor did we detect an association between BLT-1 and the anti-inflammatory effect of RvE1. Further studies may reveal new interaction points of RvE1.

7. Abkürzungsverzeichnis

18R-HEPE	18R-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
ALI	acute lung injury, akute Lungenschädigung
ARDS	acute respiratory distress syndrome
ADP	Adenodiphosphat
AMP	Adenosinmonophasphat
ATP	Adenosintriphosphat
ALA	Alpha-Linolensäure
ATS	American Thoracic Society
APS	Ammoniumpersulfat
5-Lox	Arachidonat-5-Lipoxygenase
AA	Arachidonsäure
BSA	bovines Serumalbumin
FCCP	carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
ChemR23	Chemerin Receptor 23
CMKLR1	chemokine like receptor 1
CAP	community-aquired pneumonia
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAMP	danger associated molecular patterns
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DHA	Docosahexaensäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRP-1	dynamin related protein 1
DY	Dynasore
EPA	Eicosapentaensäure

		66
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
ERK	extracellular signal-regulated kinases	
FCS	fetales Kälberserum	
GCS	Glasgow-Coma-Scale	
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor	
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor	
GTP	Guanosintriphosphat	
HAP	hospital-aquired pneumonia	
PVMD-Membran	Immobilon-P Transfer Membran	
IDSA	Infectious Diseases Society of America	
IAP	institution-acquired pneumonia	
IL	Interleukin	
LEAK	ist eine dissipative Komponente der Atmung, die für die Durch	1-
	führung biochemischer Arbeiten nicht zur Verfügung steht	
CAPNETZ	Kompetenznetz Ambulant erworbene Pneumonie	
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	
LTB4	Leukotriene B4	
LTC4	Leukotriene C4	
LTD4	Leukotriene D4	
BLT1	Leuktrien B4- Rezeptor 1	
LPS	Lipopolysaccharid	
M1	Makrophagen Typ 1	
M2	Makrophagen Typ 2	
MAX	Maximale Atmung in der Respirometry	
Mdivi	Mdivi-1, 3-(2,4-Dichloro-5-methoxyphenyl)-2,3-dihydro-2-	
	thioxo-4(1H)-quinazolinone	
FIS-1	Mitochondrial fission 1 protein	
MRC	mitochondrial respiratory chain	
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure	
MFN1	Mitofusin-1	

MFN2	Mitofusin-2
MAPK	mitogen-activated protein kinases
МСР	Monozyten-Chemoattraktant-Protein
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
SDS	Natriumdodecylsulfat
NF-ĸB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer
nDNA	nukleare Desoxyribonukleinsäure
OPA-1	optic atrophy gen 1
NAD+	oxidierte Form Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PRR	pattern recognition receptors
Ct	PCR-Zyklusanzahl
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMN	polymorphonuclear cell
PUFA	polyunsaturated fatty acids
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid
Akt	Proteinkinase B
qSOFA	quick Sequential Organ Failure Assessment
ROS	Reactive Oxygen Species, Sauerstoffradikale
qPCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
NADH	reduzierte Form Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
rM	resolution phase macrophages
RvD1	Resolvin D1
RvE1	Resolvin E1
RvE2	Resolvin E2
RvE3	Resolvin E3
RvD	Resolvine D
RvE	Resolvine E
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure

RLT	RNeasy Lysis Buffer	
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment	
SPM	specialized proresolving mediators	
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom	
TLR	Toll-like-Rezeptor	
TGF	transformierenden Wachstumsfaktor	
TRIS	Tris Pufferan [®]	
TBS	Tris-Buffered-Saline-Puffer	
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α	
p53	humaner Tumorsuppressor p53	
TBS-T	Waschpuffer für Western Blot auf Basis des Tris-Buffered-	
	Saline-Puffer	
WB	Western Blot	
8. Abbildungsverzeichnis

8
Abbildung 1: Standardablauf eines Experimentes zur Bestimmung der mitochondrialen Atmung unter Nutzung der <i>high-resolution respirometry</i> . Die graue Linie stellt den Sauerstoffgehalt in der Kammer dar, die Schwarze die mitochondriale Atmung. Die wichtigsten Parameter sind in den grauen Boxen hinterlegt: <i>Routine = Routine</i> <i>respiration, Leak = Leak respiration, Max = Maximal respiration</i>
Abbildung 2: Produktion von Interleukin 6 (A) und Interleukin 8 (B) nach Zugabe von TNF-α und nach Zugabe von TNF-α und Resolvin E1 im Vergleich zu der Kontrollgruppe und alleiniger Zugabe von Resolvin E1. Deutlich erkennbar die verminderte Produktion beider Interleukine nach Zugabe von Resolvin E1 bei simultierter Entzündung
Abbildung 3: Einfluss von TNF-α und Resolvin E1 auf die Expression verschiedener Cell stress (oben) und Apoptose (unten) –Proteine. In den Kästchen markiert sind: p38α [A], HSP60 [B], PON2 [C], COX-2 [D], SIRT2 [E], SOD2 [F], and p21 [G]45 Abbildung 4: Auswirkungen der Blockierung des BLT-1-Rezeptors mit CP-105696 unter Zugabe von TNF-α und Resolvin E1 jeweils im Vergleich ohne Blockierung des Rezeptors
Abbildung 5: Veränderungen der Zellatmung unter experimenteller Entzündung und der Zugabe von Resolvin E1. Unter inflammatorischen Bedingungen war die maximale Zellatmung signifikant geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe (* $p < 0,05$), welche jedoch durch Resolvin E1 wiederhergestellt werden konnte (# $p < 0,05$)
Abbildung 6: Es wurden keine signifikanten Veränderungen des Gehaltes an mtDNA unter der Einwirkung von Resolvin E1 festgestellt
Abbildung 7: Veränderungen der Proteinexpression von Fission und Fusion-Proteinen unter dem Einfluss von Resolvin E1
Abbildung 8: Banden der Proteine FIS-1 und MFN-1 im Westernblot im Vergleich zu beta-actin (housekeeping gen)
Abbildung 9: Verhältnis von FIS-1 (A) und MFN-1 (B) jeweils zu beta-actin (housekeeping gen)
Abbildung 10: Einfluss von Mdivi und Dynasore auf die Bildung proinflammatorischer Zytokine IL-6 (A) und Il-8 (B) [pg/ml]
Abbildung 11: Veränderung der Zellatmung unter dem Einfluss von Mdivi und Dynasore

	70
9. Tabellenverzeichnis	
Tabelle 1: Risikogruppen nach CRB 65 Score nach [66]	2
Tabelle 2: Modifizierte Minorkriterien zur Beurteilung der Notwendigkeit derIntensivtherapie bei ambulant erworbener Pneumonie [42]	4
Tabelle 3: Die definierten Zeichen der klinischen Stabilität erfolgreicher Pneumonietherapie [42]	4
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper	41

10. Literaturverzeichnis/Quellenangaben

- 1. Burden of Disease Project. World Health Organization.
- 2. The top 10 causes of death. 2018 24 May 2018; Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death.
- Ahmad, T., et al., Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. The EMBO Journal, 2014. 33(9): p. 994-1010.
- Alberts, B., et al., Molecular Biology of the Cell, (Garland Science, New York, 2008). Google Scholar, 2002: p. 652.
- Aliberti, S., et al., Incidence, etiology, timing, and risk factors for clinical failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. Chest, 2008. 134(5): p. 955-962.
- Allenbach, C., et al., Macrophages induce neutrophil apoptosis through memb rane TNF, a process amplified by Leishmania major. J Immunol, 2006. 176(11): p. 6656-64.
- Arastéh, K., et al., Duale Reihe Innere Medizin 3. Auflage. 2013: 2017 Georg Thieme Verlag KG. 387.
- Arimura, S., et al., Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(20): p. 7805-8.
- Arita, M., et al., Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. J Exp Med, 2005. 201(5): p. 713-22.
- Arita, M., et al., Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. J Immunol, 2007. 178(6): p. 3912-7.
- Arita, M., et al., Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acidinduced colitis. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(21): p. 7671-6.
- Arulkumaran, N., et al., Mitochondrial Function in Sepsis. Shock, 2016. 45(3): p. 271-81.

- Azevedo, L.C., Mitochondrial dysfunction during sepsis. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2010. 10(3): p. 214-23.
- Bannenberg, G. and C.N. Serhan, Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. Biochim Biophys Acta, 2010. 1801(12): p. 1260-73.
- Barry, K.C., et al., IL-1α signaling initiates the inflammatory response to virulent Legionella pneumophila in vivo. The Journal of Immunology, 2013. 190(12): p. 6329-6339.
- 16. Beck-Schimmer, B., et al., Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. Respir Res, 2005. 6: p. 61.
- Belikova, I., et al., Oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells in severe human sepsis. Crit Care Med, 2007. 35(12): p. 2702-8.
- Bilal, S., et al., Fat-1 transgenic mice with elevated omega-3 fatty acids are protected from allergic airway responses. Biochim Biophys Acta, 2011. 1812(9): p. 1164-9.
- 19. Brealey, D., et al., Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. Lancet, 2002. 360(9328): p. 219-23.
- Brealey, D., et al., Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. 286(3): p. R491-7.
- Chatre, L., et al., A novel paradigm links mitochondrial dysfunction with muscle stem cell impairment in sepsis. Biochim Biophys Acta, 2017. Volume 1863, Issue 10, Part B: p. 2546-2553.
- Chen, C., et al., Mitochondrial Fission Inhibitors Suppress Endothelin-1-Induced Artery Constriction. Cell Physiol Biochem, 2017. 42(5): p. 1802-1811.
- Chen, H., A. Chomyn, and D.C. Chan, Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. J Biol Chem, 2005. 280(28): p. 26185-92.
- 24. Chen, H., et al., Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. Cell, 2010. 141(2): p. 280-9.

- Chertov, O., et al., Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. J Exp Med, 1997. 186(5): p. 739-47.
- Clere-Jehl, R., et al., Septic Shock Alters Mitochondrial Respiration of Lymphoid Cell-Lines and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: The Role of Plasma. SHOCK, 2018. 51(1): p. 97–104.
- Colas, R.A., et al., Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue. Am J Physiol Cell Physiol, 2014. 307(1): p. C39-54.
- Colgan, S.P., Neutrophils and Inflammatory Resolution in the Mucosa. Seminars in immunology, 2015. 27(3): p. 177-183.
- 29. Corrales-Medina, V.F., et al., Cardiac complications in patients with community-acquired pneumonia: incidence, timing, risk factors, and association with short-term mortality. Circulation, 2012. 125(6): p. 773-81.
- Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. Biochem J, 2010. 429(3): p. 403-17.
- Dalhoff, K., S. Ewig, and G. on behalf of the Gideline Development, Adult Patients With Nosocomial Pneumonia: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. Deutsches Ärzteblatt International, 2013. 110(38): p. 634-640.
- Dare, A.J., et al., A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. Free Radic Biol Med, 2009. 47(11): p. 1517-25.
- 33. Delettre, C., et al., Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. Nat Genet, 2000. 26(2):p. 207-10.
- Deutschman, C.S. and K.J. Tracey, Sepsis: current dogma and new perspectives. Immunity, 2014. 40(4): p. 463-75.
- Dremsizov, T., et al., Severe Sepsis in Community-Acquired Pneumonia. CHEST, 2006. 129(4): p. 968-978.
- 36. Dremsizov, T., et al., Severe sepsis in community-acquired pneumonia: when does it happen, and do systemic inflammatory response syndrome criteria help predict course? Chest, 2006. 129(4): p. 968-78.

- Droge, W., Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev, 2002. 82(1): p. 47-95.
- 38. Duvall, M.G. and B.D. Levy, DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. Eur J Pharmacol, 2016. 785: p. 144-55.
- 39. Engel, C., et al., Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. Intensive Care Med, 2007. 33(4): p. 606-18.
- 40. Estabrook, R.W., Effect of oligomycin on the arsenate and DNP stimulation of mitochondrial oxidations. Biochem Biophys Res Commun, 1961. 4: p. 89-91.
- 41. Ewig, S., et al., New perspectives on community-acquired pneumonia in 388406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. Thorax, 2009. 64(12): p. 1062-9.
- 42. Ewig, S., et al., [Management of Adult Community-acquired Pneumonia and Prevention Update 2016]. Pneumologie, 2016. 70(3): p. 151-200.
- 43. Fan, L.F., et al., Mdivi-1 ameliorates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via the suppression of inflammation-related blood-brain barrier disruption and endoplasmic reticulum stress-based apoptosis. Free Radic Biol Med, 2017. 112: p. 336-349.
- 44. Fink, M.P., Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. Crit Care, 2002. 6(6):p. 491-9.
- 45. Foster, K.A., et al., Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. Exp Cell Res, 1998. 243(2): p. 359-66.
- 46. Frank, S., et al., The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. Dev Cell, 2001. 1(4): p. 515-25.
- 47. Fujishima, S., Pathophysiology and biomarkers of acute respiratory distress syndrome. J Intensive Care, 2014. 2(1): p. 32.
- 48. Furlong, C.E., et al., Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? Chem Biol Interact, 2016. 259(Pt B): p. 51-62.
- 49. Galley, H.F., Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. British Journal of Anaesthesia, 2011. 107(1): p. 57-64.

- 50. Garcia-Ruiz, C., et al., Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. J Biol Chem, 1997. 272(17): p. 11369-77.
- Garrabou, G., et al., The Effects of Sepsis on Mitochondria. The Journal of Infectious Diseases, 2012. 205(3): p. 392-400.
- 52. Gasparetto, A., et al., Effect of tissue hypoxia and septic shock on human skeletal muscle mitochondria. Lancet, 1983. 2(8365-66): p. 1486.
- 53. Gellerich, F.N., et al., Impaired energy metabolism in hearts of septic baboons: diminished activities of Complex I and Complex II of the mitochondrial respiratory chain. Shock, 1999. 11(5): p. 336-41.
- 54. Giard, D.J., et al., In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J Natl Cancer Inst, 1973. 51(5): p. 1417-23.
- Gnaiger, E., Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis, O. Instruments, Editor. 2014, Mitochondr-Physiol-Network-19.12.: Oroboros-MiPNet-Publications 2014.
- Gonzalez, A.S., et al., Abnormal mitochondrial fusion-fission balance contributes to the progression of experimental sepsis. Free Radic Res, 2014. 48(7): p. 769-83.
- 57. Goode, H.F., et al., Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. Crit Care Med, 1995. 23(4): p. 646-51.
- 58. Hamilton, T.A., et al., Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization. Front Immunol, 2014. 5: p. 554.
- 59. Hecker, M., et al., PPAR-alpha activation reduced LPS-induced inflammation in alveolar epithelial cells. Exp Lung Res, 2015. 41(7): p. 393-403.
- 60. Hecker, M., et al., Immunomodulation by lipid emulsions in pulmonary inflammation: a randomized controlled trial. Crit Care, 2015. 19: p. 226.
- Hecker, M., et al., Resolvin E1 and its precursor 18R-HEPE restore mitochondrial function in inflammation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular and Cell Biology of Lipids, 2018. 1863(9): p. 1016-1028.

- Hecker, M., N. Sommer, and K. Mayer, Assessment of short- and medium-chain fatty acids on mitochondrial function in severe inflammation. Methods Mol Biol, 2015. 1265: p. 389-96.
- Hecker, M., et al., Impact of short- and medium-chain fatty acids on mitochondrial function in severe inflammation. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2014. 38(5): p. 587-94.
- 64. Hecker, M., et al., Clinical Aspects of Acute Lung Insufficiency (ALI/TRALI). Transfus Med Hemother, 2008. 35(2): p. 80-88.
- Herova, M., et al., ChemR23, the receptor for chemerin and resolvin E1, is expressed and functional on M1 but not on M2 macrophages. J Immunol, 2015. 194(5): p. 2330-7.
- 66. Hoffken, G., et al., [Guidelines for the epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults]. Dtsch Med Wochenschr, 2010. 135(8): p. 359-65.
- 67. Hotchkiss, R.S., et al., Cell Death. New England Journal of Medicine, 2009.361(16): p. 1570-1583.
- 68. Huang, L.-s., et al., Binding of the Respiratory Chain Inhibitor Antimycin to the Mitochondrial bc(1) Complex: A new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. Journal of molecular biology, 2005. 351(3): p. 573-597.
- Ishida, T., et al., Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium induced colitis. Inflammatory bowel diseases, 2010. 16(1): p. 87-95.
- Islam, M.N., et al., Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. Nat Med, 2012. 18(5): p. 759-65.
- 71. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science, 2010. 327(5963): p. 291-5.
- 72. Jakobs, S., High resolution imaging of live mitochondria. Biochim Biophys Acta, 2006. 1763(5-6): p. 561-75.

- 73. Kakkar, P. and B.K. Singh, Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. Mol Cell Biochem, 2007. 305(1-2): p. 235-53.
- 74. Kamminga, H., Metchnikoff and the origins of immunology: From metaphor to theory: Alfred I. Tauber and Leon Chernyak Monographs on the History and Philosophy of Biology (Oxford: Oxford University Press, 1991). Studies in History and Philosophy of Science Part A, 1994. 25(1): p. 131-145.
- 75. Kasuga, K., et al., Rapid appearance of resolvin precursors in inflammatory exudates: novel mechanisms in resolution. J Immunol, 2008. 181(12): p. 8677-87.
- Keyes, K.T., et al., Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury.Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. 299(1): p. H153-64.
- 77. Knott, A.B. and E. Bossy-Wetzel, Impairing the Mitochondrial Fission and Fusion Balance: A New Mechanism of Neurodegeneration. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008. 1147: p. 283-292.
- Kolditz, M. and S. Ewig, Community-Acquired Pneumonia in Adults. Deutsches Ärzteblatt International, 2017. 114(49): p. 838-848.
- 79. Krüger, S. and D. Frechen, Cardiovascular Complications in Communityacquired Pneumonia. Clinical Pulmonary Medicine, 2015. 22(2): p. 62-67.
- Levy, M.M., et al., 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med, 2003. 31(4): p. 1250-6.
- Lewis, A.J., T.R. Billiar, and M.R. Rosengart, Biology and Metabolism of Sepsis: Innate Immunity, Bioenergetics, and Autophagy. Surg Infect (Larchmt), 2016. 17(3): p. 286-93.
- Li, H.-y., et al., Modified IDSA/ATS Minor Criteria for Severe Community-Acquired Pneumonia Best Predicted Mortality. Medicine, 2015. 94(36): p. e1474.
- Liaw, K.Y., et al., Effect of injury and sepsis on high-energy phosphates in muscle and red cells. J Trauma, 1980. 20(9): p. 755-9.
- Lim, W., et al., Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. Thorax, 2003. 58(5): p. 377-382.

- 85. Macia, E., et al., Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin. Developmental Cell, 2006. 10(6): p. 839-850.
- Mantzarlis, K., V. Tsolaki, and E. Zakynthinos, Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. Oxid Med Cell Longev, 2017. vol. 2017(Article ID 5985209, 10 pages).
- Martin, T.R., Interactions between Mechanical and Biological Processes in Acute Lung Injury. Proc Am Thorac Soc, 2008. 5(3): p. 291-6.
- Martin, T.R., Interactions between Mechanical and Biological Processes in Acute Lung Injury. Proceedings of the American Thoracic Society, 2008. 5(3): p. 291-296.
- 89. Matthay, M.A., L.B. Ware, and G.A. Zimmerman, The acute respiratory distress syndrome. The Journal of Clinical Investigation, 2012. 122(8): p. 2731-2740.
- McCracken, J.M. and L.-A.H. Allen, Regulation of Human Neutrophil Apoptosis and Lifespan in Health and Disease. Journal of Cell Death, 2014. 7: p. JCD.S11038.
- 91. Mittal, M., et al., Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. Antioxidants & Redox Signaling, 2014. 20(7): p. 1126-1167.
- 92. Miyahara, T., et al., D-series resolvin attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hyperplasia following vascular injury. The FASEB Journal, 2013. 27(6): p. 2220-2232.
- 93. Mizgerd, J.P., Lung infection--a public health priority. PLoS Med, 2006. 3(2):p. e76.
- 94. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol, 1987. 155: p. 335-50.
- 95. Myint, P.K., et al., Performance of CURB-65 and CURB-age in communityacquired pneumonia. Int J Clin Pract, 2009. 63(9): p. 1345-50.
- 96. Nakada, K., et al., Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. Nat Med, 2001. 7(8): p. 934-40.
- 97. Nunnari, J., et al., Mitochondrial transmission during mating in Saccharomyces cerevisiae is determined by mitochondrial fusion and fission and the

intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. Molecular Biology of the Cell, 1997. 8(7): p. 1233-1242.

- 98. Ohira, T., et al., Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis. J Biol Chem, 2010. 285(5): p. 3451-61.
- 99. Opitz, B., et al., Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. Am J Respir Crit Care Med, 2010. 181(12): p. 1294-309.
- Park, D.W. and J.W. Zmijewski, Mitochondrial Dysfunction and Immune Cell Metabolism in Sepsis. Infection & Chemotherapy, 2017. 49(1): p. 10-21.
- Park, J., et al., Mitochondrial dynamics modulate the expression of proinflammatory mediators in microglial cells. J Neurochem, 2013. 127(2): p. 221-32.
- 102. Phua, J., W.J. Ngerng, and T.K. Lim, The impact of a delay in intensive care unit admission for community-acquired pneumonia. European Respiratory Journal, 2010. 36(4): p. 826.
- 103. Pletz, M.W., et al., [Epidemiology and Aetiology of Community-acquired Pneumonia (CAP)]. Dtsch Med Wochenschr, 2011. 136(15): p. 775-80.
- 104. Poon, I.K., et al., Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. Nat Rev Immunol, 2014. 14(3): p. 166-80.
- 105. Qu, Q., W. Xuan, and G.H. Fan, Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation. Cell Biol Int, 2015. 39(1): p. 3-22.
- 106. Qu, X., et al., Resolvins E1 and D1 inhibit interstitial fibrosis in the obstructed kidney via inhibition of local fibroblast proliferation. J Pathol, 2012. 228(4): p. 506-19.
- 107. Rassam, M.B. and S.A. Al-Mudhaffar, The micro-ELISA sandwich technique for the quantitation of Leishmania donovani soluble antigen. Ann Trop Med Parasitol, 1980. 74(6): p. 591-5.
- Reddy, P.H., Inhibitors of mitochondrial fission as a therapeutic strategy for diseases with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. J Alzheimers Dis, 2014. 40(2): p. 245-56.
- 109. Rello, J., Demographics, guidelines, and clinical experience in severe community-acquired pneumonia. Critical care, 2008. 12(6): p. S2.

- 110. Rittirsch, D., M.A. Flierl, and P.A. Ward, Harmful molecular mechanisms in sepsis. Nature reviews. Immunology, 2008. 8(10): p. 776-787.
- 111. Rubbo, H., A. Denicola, and R. Radi, Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of Trypanosoma cruzi energetic metabolism and inhibits cell respiration. Arch Biochem Biophys, 1994. 308(1): p. 96-102.
- 112. Scannell, M., et al., Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. J Immunol, 2007. 178(7): p. 4595-605.
- 113. Schaaf, B., et al., Sepsis severity predicts outcome in community-acquired pneumococcal pneumonia. Eur Respir J, 2007. 30(3): p. 517-24.
- 114. Seki, H., et al., The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. J Immunol, 2010. 184(2): p. 836-43.
- 115. Serhan, C.N., Resolution phase of inflammation: novel endogenous antiinflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. Annu Rev Immunol, 2007. 25: p. 101-37.
- 116. Serhan, C.N., A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. Histochem Cell Biol, 2004. 122(4): p. 305-21.
- 117. Serhan, C.N. and N. Chiang, Resolution Phase Lipid Mediators of Inflammation: Agonists of Resolution. Current opinion in pharmacology, 2013. 13(4): p. 632-640.
- 118. Serhan, C.N., N. Chiang, and J. Dalli, The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. Semin Immunol, 2015. 27(3): p. 200-15.
- Serhan, C.N., et al., Lipid Mediators in the Resolution of Inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. 7(2: a016311).
- 120. Serhan, C.N., et al., Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. J Exp Med, 2000. 192(8): p. 1197-204.

- 121. Serhan, C.N., et al., Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. J Exp Med, 2002. 196(8): p. 1025-37.
- 122. Shankar-Hari, M., et al., Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). Jama, 2016. 315(8): p. 775-87.
- Singer, M., Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. Crit Care Med, 2007. 35(9 Suppl): p. S441-8.
- Singer, M., et al., The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). Jama, 2016. 315(8): p. 801-10.
- 125. Sjovall, F., et al., Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. Crit Care, 2010. 14(6): p. R214.
- 126. Spees, J.L., et al., Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(5): p. 1283-8.
- 127. Stark, M.A., et al., Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. Immunity, 2005. 22(3): p. 285-94.
- 128. Steinlechner-Maran, R., et al., Oxygen dependence of respiration in coupled and uncoupled endothelial cells. Am J Physiol, 1996. 271(6 Pt 1): p. C2053-61.
- Steinlechner-Maran, R., et al., Respiratory defect as an early event in preservation-reoxygenation injury of endothelial cells. Transplantation, 1997. 63(1): p. 136-42.
- 130. Swaroop, S., et al., HSP60 plays a regulatory role in IL-1beta-induced microglial inflammation via TLR4-p38 MAPK axis. J Neuroinflammation, 2016. 13: p. 27.
- Tager, A.M., et al., Bltr Mediates Leukotriene B (4) Induced Chemotaxis and Adhesion and Plays a Dominant Role in Eosinophil Accumulation in a Murine Model of Peritonitis. The Journal of Experimental Medicine, 2000. 192(3): p. 439-446.
- 132. Takano, T., et al., Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. Arch Virol, 2009. 154(5): p. 775-81.

- 133. Tanaka, A. and R.J. Youle, A Chemical Inhibitor of DRP1 Uncouples Mitochondrial Fission and Apoptosis. Molecular Cell, 2008. 29(4): p. 409-410.
- 134. Torio, C.M. and B.J. Moore, National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013: Statistical Brief #204, in Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs. 2006, Agency for Healthcare Research and Quality (US): Rockville (MD), http://www.hcup-us.ahrq .gov/reports/statbriefs/sb204-Most-Expensive-Hospital-Conditions.pdf.
- 135. Twig, G., et al., Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. Embo j, 2008. 27(2): p. 433-46.
- Uddin, M. and B.D. Levy, Resolvins: natural agonists for resolution of pulmonary inflammation. Prog Lipid Res, 2011. 50(1): p. 75-88.
- Unno, N., et al., Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. Gastroenterology, 1997. 113(4): p. 1246-57.
- Valentine, C.J., Maternal Dietary DHA Supplementation to Improve Inflammatory Outcomes in the Preterm Infant. Advances in Nutrition, 2012. 3(3): p. 370-376.
- 139. van der Poll, T., et al., The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. Nat Rev Immunol, 2017. 17(7): p. 407-420.
- Vary, T.C., Sepsis-induced alterations in pyruvate dehydrogenase complex activity in rat skeletal muscle: effects on plasma lactate. Shock, 1996. 6(2): p. 89-94.
- 141. Vásquez-Trincado, C., et al., Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. The Journal of Physiology, 2016. 594(3): p. 509-525.
- 142. Wang, Y., et al., Mitochondrial Fission Promotes the Continued Clearance of Apoptotic Cells by Macrophages. Cell, 2017. 171(2): p. 331-345.e22.
- 143. Webster, N.R. and J.F. Nunn, Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. Br J Anaesth, 1988. 60(1): p. 98-108.
- 144. Westermann, B., Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. 11(12): p. 872-84.
- 145. Wiegman, C.H., et al., Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with

chronic obstructive pulmonary disease. J Allergy Clin Immunol, 2015. 136(3): p. 769-80.

- 146. Woo, C.H., et al., Transepithelial migration of neutrophils in response to leukotriene B4 is mediated by a reactive oxygen species-extracellular signalregulated kinase-linked cascade. J Immunol, 2003. 170(12): p. 6273-9.
- 147. Woodhead, M., Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. European Respiratory Journal, 2002. 20(36 suppl): p. 20s-27s.
- 148. World-Health-Organisation. The top 10 Causes of death. 2018 24 May 2018; Available from: http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10causes-of-death.
- 149. Wynn, T.A. and K.M. Vannella, Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. Immunity, 2016. 44(3): p. 450-462.
- 150. Yang, J., et al., Metabolomic profiling of regulatory lipid mediators in sputum from adult cystic fibrosis patients. Free Radic Biol Med, 2012. 53(1): p. 160-71.
- Yoon, Y., et al., Mitochondrial Dynamics in Diabetes. Antioxidants & Redox Signaling, 2011. 14(3): p. 439-457.
- Youle, R.J. and A.M. van der Bliek, Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. Science, 2012. 337(6098): p. 1062-5.
- 153. Yue, L. and H. Yao, Mitochondrial dysfunction in inflammatory responses and cellular senescence: pathogenesis and pharmacological targets for chronic lung diseases. British Journal of Pharmacology, 2016. 173(15): p. 2305-2318.
- 154. Zemirli, N., E. Morel, and D. Molino, Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. International Journal of Molecular Sciences, 2018. 19(2): p. 564.
- 155. Zhan, M., et al., Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. Kidney international, 2013. 83(4): p. 568-581.
- 156. Zhang, L., et al., Drp1-dependent mitochondrial fission mediates osteogenic dysfunction in inflammation through elevated production of reactive oxygen species. PLoS ONE, 2017. 12(4): p. e0175262.

157. Zhou, Z., et al., PEDF Inhibits the Activation of NLRP3 Inflammasome in Hypoxia Cardiomyocytes through PEDF Receptor/Phospholipase A2. Int J Mol Sci, 2016. 17(12): p. 2064. doi:10.3390/ijms17122064.

11. Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zu allererst Herrn PD Dr. Matthias Hecker. Er ermöglichte mir überhaupt erst diese wissenschaftliche Arbeit und stand mir mit Rat und Tat zur Seite, unterstütze und motivierte mich über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Konstantin Mayer bedanken, er hatte immer noch einen zweiten Blickwinkel wenn es Probleme gab.

Ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe, allen voran Andrea Mohr und Katharina Kopsch, ohne ihren Einsatz und ihr Wissen in der Durchführung der Experimente wäre viele Experimente gar nicht möglich gewesen.

Meiner Mutter bin ich zutiefst für ihre uneingeschränkte Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg dankbar.

Ich bedanke mich bei meinem Bruder der jederzeit ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und mich aus der Ferne unterstützte.

Und ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Selina Haas bedanken, die soviel Verständnis für meine Arbeit aufbrachte und mir auch in schwierigen Situationen die Unterstützung war die ich in diesen Momenten brauchte.