

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie

Direktor Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität  
Marburg

Stressantwort in Ozon-induzierten Lungenschäden  
und deren Modulation durch Ambroxol

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der  
Phillips-Universität Marburg

vorgelegt von

Mariam Ilse Sachse (geb. Mirtsch) aus Hamburg

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Phillips-Universität Marburg

am: 24.05.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: PD Dr. med. C. Seifart

1. Koreferent: Prof. Dr. med. U. Kroh

## ZUSAMMENFASSUNG

Ozon verursacht als wichtiger Luftschadstoff pathologische Veränderungen des Respirationssystems sowie Einschränkungen der Lungenfunktion. Seine Toxizität beruht dabei auf seiner hohen Oxidationskraft mit Auslösung eines „oxidativen Stresses“. Dieser besteht auch unabhängig von Ozon bei Entzündungsreaktionen und wird als wichtige pathogene Komponente bei der Entstehung verschiedener Lungenerkrankungen wie beispielsweise dem Asthma bronchiale und der COPD postuliert.

Heat Shock Proteine (HSPs) werden nach Exposition mit Stress-Faktoren wie beispielsweise Hyperthermie, Inflammation und oxidativem Stress gebildet und können daher als Parameter für zellulären Stress angesehen werden. Ambroxol wird als mukolytisches Medikament bei Atemwegserkrankungen eingesetzt. Diesem Wirkstoff werden u.a. auch antioxidative Eigenschaften zugeschrieben.

Ziel dieser Arbeit ist es, die ozonvermittelte Stressantwort (HSP 32, -60, -70 und HSC 70) in der Lunge sowie eine eventuelle Protektion durch zusätzliche Ambroxolgabe zu untersuchen. Dazu wurden Sprague Dawley Ratten Ozon in unterschiedlicher Konzentration und Dauer (8h mit 1,5 bzw. 3ppm oder 12h bzw. 24h mit 0,6ppm) mit und ohne Ambroxolgabe ausgesetzt und anschließend die HSP Protein- und m-RNA-Expression im Gesamtlungengewebe mittels Western Blot und PCR bestimmt.

Die zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme der HSP 32-Expression nach Ozonexposition (360%-989,3%) wurde durch eine zusätzliche Ambroxolgabe gehemmt (119,8%). Unter Ozonexposition war vermehrt HSP 70 m-RNA (163,4%-249,8%) bei allerdings stark verminderter HSP 70 Konzentration (10,7%-53,7%) nachweisbar. Bei zusätzlich verabreichtem Ambroxol war der Proteinabfall weniger stark ausgeprägt (46,5%-69%). Die Proteinkonzentrationen von HSC 70 und HSP 60 stellen sich insbesondere bei den kürzeren Expositionszeiten (8 und 12h) vermindert dar (9,3%-55,3% bzw. 40,2%-76,3%). Unter zusätzlicher Ambroxolgabe war die Ozon-bedingte Verminderung des HSC 70 geringer ausgeprägt (61,3%), bei HSP 60 war kein eindeutiger Effekt auf die Proteinexpression nachweisbar. Eine alleinige

Ambroxolgabe bewirkte eine Hemmung von HSP 70 und HSP 60, HSP 32 war nach Ambroxolapplikation vermehrt nachweisbar, während HSC 70 kaum durch Ambroxol beeinflusst wurde.

Die Ergebnisse zeigen unterschiedliche Auswirkungen der Ozonexposition auf die verschiedenen HSPs. Ozon bewirkte eine erhöhte HSP 32 Expression, zudem war eine verstärkte Induktion der HSP 70 mRNA durch Ozon zu beobachten. HSC 70 und HSP 60 hingegen waren nach Ozon vermindert nachweisbar. Möglicherweise zeigt diese Hemmung eine Prioritätensetzung zugunsten anderer HSPs auf. Ambroxol verminderte die Ozonbedingte HSP 32 Stressantwort. Diese Beobachtung unterstreicht das Postulat von Ambroxol als eine potente antioxidative Substanz mit möglicher protektiver Wirkung auf das Lungengewebe.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Stand der Forschung	8
2.1	Ozon	8
2.1.1	Grundlagen	8
2.1.2	Ozon-Toxizität	9
2.1.3	Antioxidative Schutzmechanismen	12
2.1.4	Auswirkung einer Ozonexposition	13
2.1.5	Ozon-Toleranz	13
2.1.6	Ozon und pulmonale Erkrankungen	14
2.2	Ambroxol	15
2.2.1	Mukolytische und Surfactantstimulierende Eigenschaften	15
2.2.2	Anti-inflammatorische Eigenschaften	16
2.2.3	Antioxidative Eigenschaften	16
2.2.4	Weitere Eigenschaften	16
2.3	Hitzeschock-Proteine (HSP)	17
2.3.1	Grundlagen	17
2.3.2	HSP-Einteilung	18
2.3.3	HSP in der Lunge	22
2.3.4	Stress-Toleranz der Lunge	24
2.3.5	HSP in der Lunge nach Ozonexposition	25
3	Material und Methoden	28
3.1	Ozonexposition	28
3.1.1	Versuchsaufbau	28
3.1.2	Aufbau der Expositionsanlage	29
3.1.3	Operation und Lungen-Präparation	30
3.2	Gewebeaufarbeitung und Isolierung	30
3.2.1	Protein-Isolierung	30
3.2.2	RNA-Isolierung	31
3.2.3	c-DNA-Synthese	31
3.3	Western Blot	32
3.3.1	Grundlagen	32
3.3.2	Durchführung	34
3.4	PCR	37
3.4.1	Grundlagen	37
3.4.2	Kompetitive PCR	38
3.4.3	Durchführung	39
4	Ergebnisse	42
4.1	HSP nach Ozonexposition	43
4.1.1	HSP 32	43
4.1.2	HSP 70	45
4.1.3	HSC 70	47
4.1.4	HSP 60	49
4.2	Auswirkung alleiniger Ambroxol-Applikation	51
4.2.1	HSP 32	51
4.2.2	HSP 70	52
4.2.3	HSC 70	53
4.2.4	HSP 60	54

4.3	HSP nach Ozonexposition und Ambroxol	55
4.3.1	HSP 32.....	55
4.3.2	HSP 70.....	57
4.3.3	HSC 70.....	59
4.3.4	HSP 60.....	61
5	Diskussion	63
5.1	Auswirkungen von Ozon auf die HSP-Expression	63
5.1.1	HSP 32.....	63
5.1.2	HSP 70.....	65
5.1.3	HSC 70.....	67
5.1.4	HSP 60.....	68
5.2	Auswirkung von Ambroxol auf die Ozon-induzierte HSP-Expression	69
5.2.1	HSP 32.....	70
5.2.2	HSP 70.....	71
5.2.3	HSC 70.....	72
5.2.4	HSP 60.....	72
5.3	Wirkung alleiniger Ambroxolgabe auf HSP-Expression	73
6	Anhang	75
6.1	Literaturverzeichnis	75
6.2	Geräte	93
6.3	Chemikalien und Reagenzien	93
6.4	Übersichtstabellen	96
6.5	Ausgewählte Original Blots	98
6.5.1	Western Blot.....	98
6.5.2	PCR.....	99
6.6	Tabellarischer Lebenslauf	102
6.7	Verzeichnis der Akademischen Lehrer	103
6.8	Danksagungen	104

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

O <sub>3</sub>	Ozon
ROS	Oxidative Sauerstoffmetabolite (reactive oxygen species)
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
HSP	Hitze-Schock-Proteine
HSC	konstitutive Form des HSP 70
ppm	parts per million
h	Plancksche Konstante
f	Frequenz
NO	Stickoxid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
LLF	Lung-lining-fluid
TNF	Tumornekrosefaktor
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
IL	Interleukin
GSH	Gluthation
SOD	Superoxiddismutase
FEV <sub>1</sub>	forciertes expiratorisches Volumen in der 1. Sekunde
ARDS	Akutes Lungenversagen des Erwachsenen
IRDS	Akutes Lungenversagen des Kindes
GLN	Glutamin
HO	Hämoxigenase
HSF	Hitzeschock-Faktor

HNE	Hydroxynoneal
TEMED	Tetramethylethylenediamine
SDS	Natriumdodecylsulfat
BSA	Rinderalbumin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
PCR	Polymerasenkettenreaktion
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
m-RNA	messenger-RNA
RT	Raumtemperatur

### 1 Einleitung

Durch die Atemluft ist die Lunge ununterbrochen einer Vielzahl von Luftschadstoffen ausgesetzt. Ein wichtiger Vertreter, Ozon ( $O_3$ ), wird unter der Einwirkung von Sonnenlicht aus Stickoxiden gebildet (Falbe 1998). Stickoxide entstehen vor allem bei der Verbrennung in Kfz- und Industriemotoren. Aus diesem Grund lassen sich insbesondere an Tagen mit intensiver Sonneneinstrahlung und starker Abgasemission hohe Ozonkonzentrationen nachweisen. Die Toxizität des Ozons beruht auf seiner hohen Oxidationskraft mit der daraus folgenden Bildung oxidativer Sauerstoffmetabolite (reactive oxygen species (ROS)). Die dadurch ausgelöste Oxidation von Proteinen, Enzymen und Nukleinsäuren (Mustafa 1990) führt zur Schädigung verschiedener Organe. Durch den direkten Kontakt mit dem toxischen Gas wird die Lunge besonders stark beeinflusst. So sind beispielsweise nach akuter Ozonexposition Atemwegsentzündungen und Einschränkungen der Lungenfunktion nachweisbar (Bromberg und Koren 1995). Bei chronischer Exposition kommt es darüber hinaus zu einem fibrotischen Umbau des Lungengewebes (Stockstill et al. 1995).

Oxidative Sauerstoffmetabolite (ROS) entstehen im Körper auch ohne Ozon-Einfluss. Bei Infektionen und Entzündungen werden durch Aktivierung inflammatorischer Zellen in hohem Maße ROS freigesetzt (Halliwell et al. 1991), (Sies 1991). Aufgrund ihres hohen reaktiven Potentials erfüllen sie dabei eine wichtige Funktion in der bakteriellen Abwehr (Halliwell und Cross 1994). Bei einem ROS-Überschuss kommt es allerdings auch zur Schädigung körpereigenen Gewebes (Choi und Alam 1996). Zum Schutz gegen Oxidantien (sowohl exogener als auch endogener Art) ist die Lunge daher mit einem hoch entwickelten System aus Antioxidantien ausgestattet. Unter physiologischen Bedingungen herrscht zwischen Oxidantien und Antioxidantien ein Gleichgewicht, welches eine essentielle Voraussetzung für die normale Funktion der Lunge darstellt (Gillissen und Nowak 1998). Werden allerdings die antioxidativen Schutzmechanismen der Lunge überfordert, tritt ein so genannter oxidativer Stress auf. Typische Auslöser sind die anhaltende Stimulation von Entzündungszellen, ein Defekt des körpereigenen Antioxidationsystems oder hohe Luftverschmutzung durch Oxidantien (z.B. Ozon) (Winsel 1992).

Oxidativer Stress spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Lungenerkrankungen, insbesondere bei mehreren entzündlichen Lungenerkrankungen wie dem Asthma bronchiale, der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und der Lungenfibrose (Horvarth et al. 2001), (Repine et al. 1997). Die therapeutische Applikation körpereigener Antioxidantien hat sich allerdings angesichts einer ungünstigen Molekularmasse und Halbwertszeit als pharmakologisch ungünstig erwiesen (Gillissen und Nowak 1998). Auf der Suche nach einer geeigneten antioxidativen Substanz wurde u.a. Ambroxol (Mucosolvan®) untersucht. Dieses Medikament besitzt mukolytische, sekretolytische und Surfactant-stimulierende Eigenschaften und findet daher seit mehr als einem Jahrzehnt Anwendung bei der Behandlung akuter und chronischer Atemwegserkrankungen (Gillissen et al. 1997), (Winsel 1992). Zusätzlich inhibiert Ambroxol die von Entzündungszellen freigesetzten radikalen Sauerstoffmetabolite (ROS) (Winsel 1992), (Gillissen et al. 1997) und wirkt somit als Radikalfänger (Felix et al. 1996). Zudem hemmt Ambroxol die Peroxygenierung von Membranlipiden - die Lipidperoxygenierung (Zimmermann und Weber 1991) - die einen wichtigen Mechanismus der Toxizität des Ozons darstellt (Pryor und Church 1991).

In der vorliegenden Studie wurde bei Ozon exponierten Ratten die Auswirkung von oxidativem Stress auf die Lunge untersucht. Zudem sollte der Frage nachgegangen werden, ob Ambroxol eine protektive Funktion auf die Ozon-bedingte Lungenschädigung ausübt. Dazu wurde die Expression der Hitze-Schock-Proteine (HSPs) unter differierenden Bedingungen untersucht.

Bei den HSPs handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die die Zelle bei Stresseinwirkung produziert. Daher kann ihre Expression als Parameter für einen zellulären Stress angesehen werden (Hamilton et al. 1998).

Konkret konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf zwei Fragen:

- 1) Welche Auswirkungen hat eine Ozonexposition auf die Expression der Hitze-Schock-Proteine in der Lunge?

- 2) Inwiefern moduliert Ambroxol die durch Ozon ausgelöste HSP-Expression?  
Lässt sich daraus eventuell eine protektive Wirkung des Ambroxols herleiten?

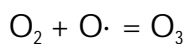
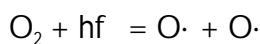
Hierzu wurden Ratten einer künstlichen Ozonatmosphäre (mit unterschiedlichen Konzentrationen und Expositionszeiten) oder Normalluft ausgesetzt. Einige Tiere wurden parallel mit Ambroxol behandelt. Anschließend wurde die HSP-Expression sowohl auf Translationsebene (Proteine im Western Blot) als auch auf Transkriptionsebene (m-RNA in der PCR) gemessen. Zur Untersuchung des Ambroxol-Einflusses wurde die HSP-Expression der mit Ambroxol behandelten Rattenlungen bestimmt und mit den Ergebnissen der alleinigen Ozonexposition verglichen (s. Kap.3).

## 2 Stand der Forschung

### 2.1 Ozon

#### 2.1.1 Grundlagen

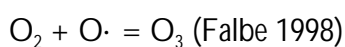
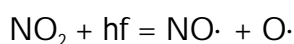
Ozon ( $O_3$ ) - ein blassblaues, äußerst giftiges Gas - ist ab einer Konzentration von 0.01ppm (parts per million) durch seinen typisch stechenden Geruch wahrnehmbar. Dieser verhalf der Substanz 1839 durch C.F. Schönbein zu seinem Namen (ózein (gr.) = duften, stinken, riechen). Ozon entsteht sowohl in der Stratosphäre (20km über der Erdoberfläche) als auch in der bodennahen Troposphäre (0-10km). In der Stratosphäre spaltet energiereiche UV-Strahlung Sauerstoffmoleküle ( $O_2$ ) zu Sauerstoff-Radikalen ( $O\cdot$ ), welche dann mit einem weiteren Sauerstoffmolekül zu Ozon ( $O_3$ ) reagieren (Falbe 1998).



(h = Plancksche Konstante, f = Frequenz) (Falbe 1998)

Aufgrund seiner hohen Reaktionsfreudigkeit zerfällt das Ozon sofort wieder in ein Sauerstoffmolekül und ein Sauerstoffradikal. Ozonbildung und -zerfall stehen somit in einem empfindlichen Gleichgewicht. Die auf diesem Wege gebildete Ozonschicht absorbiert einen großen Teil der UV-Strahlung und schützt die Erde vor deren Toxizität (McKnight 1993).

Das bodennahe Ozon der Troposphäre stellt hingegen einen gravierenden Luftschadstoff dar. Hiervon stammt nur ein geringer Anteil aus der darüber liegenden Stratosphäre; der Hauptteil entsteht in der Troposphäre durch photochemische Reaktion. In Bodennähe ist die UV-Strahlung nicht mehr stark genug, um Sauerstoff zu spalten. Stattdessen reagieren die Sauerstoffmoleküle mit Stickoxiden ( $NO_x$ ) zu Ozon:



Stickoxide entstehen bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe (z.B. in Kfz-Motoren und Industrieanlagen). Demnach können besonders hohe Ozonkonzentrationen bei der Kombination von intensiver Sonneneinstrahlung mit starker Abgasemission beobachtet werden. Dieses Phänomen ist auch als Sommersmog bzw. Los Angeles-Smog bekannt. Hierbei wird der von der WHO festgelegte Richtwert (8h-Durchschnittswert: 0,06ppm ( $120\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (WHO 2000)) häufig überschritten. Beispielsweise wurden in Europa an heißen Sommertagen Ozonkonzentrationen von über 0,2ppm gemessen (Sandström 1995). Die höchste Ozonbelastung findet während der Zeitspanne von Frühling bis Herbst statt. Dabei steigt die Ozonkonzentration typischerweise am späten Morgen – einige Stunden nach dem morgendlichen Berufsverkehr – an, erreicht am späten Nachmittag ihren Höchstwert und sinkt zum Abend wieder ab (Uysal und Schapira 2003).

### 2.1.2 Ozon-Toxizität

Die Toxizität des Ozons beruht auf seiner stark oxidativen Wirkung. Dabei erfolgt die Schädigung über zwei Mechanismen: Zum einen werden biologische Moleküle durch die direkte Reaktion mit Ozon verändert, zum anderen induziert Ozon die Bildung radikaler Sauerstoffmetabolite (z.B. Sauerstoffradikale ( $\text{O}_2\cdot$ ), Hydroxylradikale ( $\text{OH}\cdot$ ) und Wasserstoffperoxyd ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Halliwell und Cross 1994)), die das umliegende Gewebe durch weitere Oxidation schädigen können. Die Lunge ist aufgrund ihrer großen Oberfläche ( $80\text{-}100\text{m}^2$ ) und dem direktem Kontakt zu schadstoffhaltiger Luft das am stärksten durch Ozon beeinflusste Organ. Ozon gelangt aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit in hoher Konzentration in die Lungenperipherie (Putman 1996). Dort kommt es zuerst mit dem so genannten lung-lining-fluid (LLF) in Kontakt. Diese Schicht kleidet die Atemwege aus und besteht aus einer wässrigen sowie einer muzinösen Phase. Sie ist in den oberen Atemwegen sehr dick ( $1\text{-}10\mu\text{m}$ ) und reich an Antioxidantien. Letztere reagieren mit Ozon und verhindern somit seine Passage durch das LLF. Auf diese Weise werden die Lungenepithelzellen vor der direkten toxischen Ozon-Wirkung geschützt. In der Peripherie ist das LLF jedoch wesentlich dünner ( $0,2\text{-}0,5\mu\text{m}$  in den distalen Bronchiolen) und enthält weniger

Antioxidantien. Daher kommt es dort verstärkt zu einer direkten Epithelschädigung (Putman 1996), (Mudway und Kelly 2000).

Ist das LLF zu dünn oder abweichend zusammengesetzt, das antioxidative System nicht ausreichend oder die Ozonkonzentration zu groß, schädigt Ozon die Lunge auf folgende Weise:

- 1) Aufgrund seines hohen Redoxpotentials kommt es zur direkten Schädigung von Enzymen, Nukleinsäuren und Proteinen (insbesondere der Aminosäuren Cystein, Methionin und Tryptophan) (Mustafa 1990).
- 2) Eine indirekte Schädigung erfolgt durch die Bildung radikaler Sauerstoffmetabolite (ROS): Ozon zerfällt in wässriger Lösung (z.B. in der wässrigen Phase des LLFs) u.a. zu Hydroxylradikalen ( $\text{HO}\cdot$ ), Wasserstoffperoxyd ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Sauerstoffradikalen ( $\text{O}\cdot$ ). Diese schädigen das Gewebe dann durch weitere Oxidation (Mustafa 1990).
- 3) Durch Peroxygenierung ungesättigter Fettsäuren (sog. Lipidperoxygenierung) des LLF sowie der Zellmembrane entstehen Wasserstoffperoxid und Aldehyde. Diese toxischen Substanzen können die Alveolar-Kapillar-Barriere durchdringen und so an weiter entfernten Strukturen Schäden hervorrufen (Pryor und Church 1991). Zudem führt die Peroxygenierung zu einer Beeinträchtigung der Zellmembrane, die sich in einer erhöhten Permeabilität der Membrane und folglich einer verminderten Barrierefunktion zeigt (Mustafa 1990).
- 4) Ozon löst im Lungengewebe (u.a. über den Arachnoidonsäure-Zyklus) Entzündungsreaktionen mit Aktivierung und Einwanderung inflammatorischer Zellen aus (Bhalla 1999), (Mudway und Kelly 2000). Im aktivierten Zustand produzieren vor allem Granulozyten und Makrophagen ROS und proteolytische Enzyme (Bhalla 1999). Darüber hinaus werden bei der Entzündungsreaktion Mediatoren wie Interleukine und Tumornekrosefaktoren (TNF) freigesetzt. Diese induzieren ebenfalls die ROS-Bildung und können damit den oxidativen Stress noch weiter verstärken (Gillissen und Nowak 1998).

- 5) Aufgrund einer Ozon-bedingten Schädigung der epithelialen Verbindungsstrukturen (sog. tight junctions) wird die Schrankenfunktion der Lungenepithelzellen beeinträchtigt. Auf diese Weise verliert die Lunge einen wichtigen Schutzmechanismus gegen das Eindringen exogener Partikel in das Interstitium (Bhalla 1999).
- 6) Ozon beeinflusst zudem das Surfactant System in der Lunge: Surfactant stellt ein komplexes Gemisch aus u.a. Phospholipiden und den surfactantspezifischen Proteinen SP-A, SP-B, SP-C und SP-D dar. Es kleidet als Bestandteil des LLF die unteren Atemwege aus, vermindert dort die Oberflächenspannung und verhindert so das Kollabieren der Alveolen während der Expiration (Clements und Tierney 1965), (King 1982). Ozonexposition bewirkt eine Strukturveränderung der Surfactant Subtypen (Putman et al. 1995), (Putman et al. 1997) sowie eine Erhöhung der Oberflächenspannung (Nachtman et al. 1986), (Müller et al. 1998).

Als ein weiterer pathogener Mechanismus in der Ozonbedingten Toxizität wird die Oxidierung des Stickstoffoxids (NO) diskutiert. Die dadurch entstehenden reaktiven Metabolite könnten zur Entzündungsreaktion in der Lunge beitragen. Bei mit Ozon behandelten Meerschweinchen wurde neben der Entwicklung einer Bronchokonstriktion auch eine erhöhte Konzentration NO in der bronchoalveolären Lavage (BAL) festgestellt (Toward und Broadley 2002). Die Vorbehandlung mit NO Synthase Inhibitor hingegen verhinderte die Ozonbedingte Hyperreaktivität der Atemwege sowie den Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der BAL (Inoue et al. 2000). Zudem zeigten Mäuse, denen die induzierbare Form der NO Synthase (iNOS) fehlte, keine Ozoninduzierten Entzündungsreaktionen (Fakhrzadeh et al. 2002).

Die toxische Wirkung des Ozons ist nicht auf bestimmte Zellen oder Regionen der Lunge beschränkt. Allerdings findet die stärkste Ozonschädigung in den distalen Anteilen statt, insbesondere in den terminalen Bronchiolen, den bronchio-alveolären Übergängen und den proximalen Alveolargängen. Besonders anfällig sind Typ-1 Pneumozyten, zilienträgende Epithelzellen und Alveolarmakrophagen: So wurden nach akuter Ozonexposition Nekrosen der Typ-1 Pneumozyten und Ziliarepithelien

sowie ein Zilienverlust beobachtet (Mudway und Kelly 2000). Des Weiteren reduzierte Ozon die Anzahl der Alveolarmakrophagen (Bhalla 1999).

Die durch Ozon verursachte Entzündungsreaktion des Lungengewebes induziert die Einwanderung neutrophiler Granulozyten. Dieser Anstieg wurde sowohl in der Biopsie (Aris et al. 1993) als auch in der bronchoalveolären Lavage (BAL) (Schelegle et al. 1991) nachgewiesen.  $O_3$  erhöht ebenfalls die Anzahl der Mastzellen (Blomberg, Mudway et al. 1999), die eine entscheidende Quelle für pro-inflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1, IL-3 und IL-6 darstellen. Da diese wiederum die Einwanderung der Granulozyten induzieren, könnten die Mastzellen eine wichtige Rolle in der Granulozyten-Rekrutierung nach Ozonexposition spielen (Mudway und Kelly 2000).

### 2.1.3 Antioxidative Schutzmechanismen

Zum Schutz gegen oxidative Schädigung ist die Lunge mit einem hochentwickelten antioxidativen Schutzsystem ausgestattet. Dieses besteht in eukaryontischen Zellen sowohl aus nicht-enzymatischen als auch aus enzymatischen Komponenten. Zu der erstgenannten Gruppe gehören Gluthation (GSH), Vitamine, Bilirubin, Albumin und Ceruloplasmin. Die enzymatischen Antioxidantien beinhalten die Familie der Superoxiddismutase (SODs), die Katalase sowie die Gluthationperoxidase (Choi und Alam 1996). Die wichtigsten antioxidativen Funktionen üben der GSH-Redoxzyklus, die Katalase sowie die SODs aus: Durch Oxidation von GSH wird mit Hilfe der Gluthationperoxidase Wasserstoffperoxyd zu Sauerstoff und Wasser umgewandelt (Gillissen und Nowak 1998). Die Katalase übt ebenfalls eine  $H_2O_2$ -neutralisierende Funktion aus, während die SODs Superoxidradikale ( $O_2\cdot^-$ ) eliminieren (Choi und Alam 1996). Unter physiologischen Umständen herrscht ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien. Ist dieses zugunsten der Oxidantien verschoben, kommt es zum so genannten oxidativen Stress mit folgender Gewebeschädigung (siehe 2.1.2) (Halliwell und Cross 1994).

### 2.1.4 Auswirkung einer Ozonexposition

Hohe Ozonkonzentrationen (4-10ppm) wirken sich durch Ausbildung eines schweren Lungenödems oftmals letal aus (Mustafa 1990). 1-2ppm Ozon verursachen irreversible Lungenschäden, niedrigere Ozonkonzentrationen hingegen eine noch reversible Zellschädigung mit Entzündung und passagerer Einschränkung der Lungenfunktion (Putman 1996). Beispielsweise wiesen Kinder, die in einem amerikanischen Sommercamp Ozonkonzentrationen von über 0,12ppm Ozon ausgesetzt waren, eine erniedrigte Einsekundenkapazität (forciertes expiratorisches Volumen in der 1. Sekunde (FEV<sub>1</sub>)) auf. Diese Einschränkung hielt bis zu drei Tage nach Exposition an (Berry et al. 1991). Kinder haben ein im Verhältnis zu ihrem Körpergewicht größeres Atemvolumen als Erwachsene und sind deshalb besonders bei intensiver Bewegung (Spielen im Freien) und daraus resultierendem höherem Atemvolumen stärker durch Ozon gefährdet. Allerdings wurde auch bei Erwachsenen unter ähnlich erhöhten Ozonwerten und körperlicher Betätigung – wie z.B. beim Joggen (Spektor et al. 1988) oder Rennradfahren (Avol et al. 1984) - eine FEV<sub>1</sub>-Reduktion festgestellt. Sogar bei Konzentrationen nahe der von der WHO empfohlenen Richtlinie (s.o.) findet eine Lungenschädigung statt. Beispielsweise zeigten Delvin et al., dass bereits eine Exposition von 0,08ppm Ozon für 6,6h zu einer deutlichen Entzündungsreaktion in der Lunge führte (Devlin et al. 1991).

Eine chronische Ozonexposition führt darüber hinaus zu einem Gewebeumbau in der Lunge. Bei Ratten, die 20 Monate 0,5 bzw. 1ppm Ozon ausgesetzt waren, ließ sich eine Fibrosierung der Alveolarwände sowie eine bronchioläre Metaplasie der Alveolargänge, d.h. ein Ersatz der alveolären Typ-1 und Typ-2 Pneumozyten durch bronchioläre Epithelzellen, beobachten (Stockstill et al. 1995), (Plopper et al. 1994). Des Weiteren findet in chronisch exponierten Lungen eine Proliferation der Typ-2 Pneumozyten statt (Chang et al. 1992).

### 2.1.5 Ozon-Toleranz

Bei wiederholter täglicher Exposition tritt eine partielle Toleranz gegenüber O<sub>3</sub> auf. Diese äußert sich in einer Verminderung der ozonbedingten Symptome bzw. Befunde

(Folinsbee et al. 1980). So stellte sich bei ozonexponierten Probanden am vierten Tag eine Normalisierung der durch Ozon verminderten Lungenfunktionsparameter ein. Diese Toleranz hielt für 4-7 Tage nach Beendigung der Exposition an, d.h. nach dieser Zeitspanne traten bei den Probanden wieder Ozon-typische Reaktionen auf (Horvath et al. 1981). Auch die zelluläre Entzündungsreaktion unterliegt einer gewissen Adaptation: Nach viertägiger Exposition mit 0,2ppm Ozon nahm beispielsweise die Anzahl der Ozon-induzierten neutrophilen Granulozyten und Interleukine wieder ab (Christian et al. 1998). Dieser Toleranzerwerb kommt möglicherweise durch Ersatz der Alveolarepithelien durch die gegenüber Ozon resistenteren Bronchialepithelzellen (siehe 2.1.4) zustande (Plopper et al. 1994). Des Weiteren könnten die nach chronischer Ozonexposition erhöhten Konzentrationen der antioxidativen Enzyme GSH (Duan et al. 1996) und die der SOD-Familie (Weller et al. 1997) für die Adaptation verantwortlich sein.

### 2.1.6 Ozon und pulmonale Erkrankungen

An Tagen mit starker Luftverschmutzung (u.a. durch Ozon) werden überdurchschnittlich viele Krankenhauseinweisungen durch respiratorische Beschwerden beobachtet (Thurston et al. 1992). Zudem belegen epidemiologische Studien einen positiven Zusammenhang zwischen dem O<sub>3</sub>-Luftgehalt und dem Auftreten von Asthma bronchiale (Abbey et al. 1991) bzw. dem Risiko asthmatischer Exazerbationen (Whittemore and Korn 1980). Ozon führt bei Asthmatikern zu einer Erhöhung der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Peden et al. 1997) sowie zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber inhalierten Allergenen. Somit führt nach Ozonexposition bereits eine deutlich geringere Allergenmenge zu einer signifikanten FEV<sub>1</sub>-Reduktion (Jorres et al. 1996). Mehrere Studien beschreiben ein vermehrtes Auftreten von Exazerbationen der chronischen obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease (COPD)) an Tagen mit hohem O<sub>3</sub>-Luftgehalt (Anderson et al. 1997), (Delfino et al. 1994), (Dockery et al. 1993). Bisher gibt es keine Arbeiten, die eine Neuentstehung von Asthma bronchiale oder COPD durch Ozonexposition belegen, vielmehr werden Exazerbationen diese Erkrankungen durch Ozon ausgelöst oder verstärkt (Uysal und Schapira 2003).

## 2.2 Ambroxol

Ambroxol [trans-4-(2-amino-3,5-dibromobenzylaminocyclohexanhydrochlorid)] findet bei zahlreichen Atemwegserkrankungen eine breite therapeutische Anwendung. Diese ist zum einen durch sein großes Wirkungsspektrum, zum anderen durch sein günstiges pharmakodynamisches Verhalten bedingt (Winsel 1992). Ambroxol besitzt eine große Affinität zum Lungengewebe und erreicht deshalb dort bereits bei relativ geringen Dosierungen hohe Konzentrationen (Winsel 1992). Nach Ambroxol-Applikation kann beispielsweise eine 20fach höhere Konzentration im Lungengewebe als im Serum nachgewiesen werden (Mezzetti et al. 1990).

### 2.2.1 Mukolytische und Surfactantstimulierende Eigenschaften

Ambroxol wird als mukolytisches Medikament bei der Behandlung von Atemwegserkrankungen eingesetzt, die mit pathologischen Veränderungen von Sekretbildung und -transport einhergehen (Winsel 1992), wie beispielsweise die chronische Bronchitis (Ericsson et al. 1987), (Cegla 1988), (Olivieri et al. 1987). Durch Induktion eines dünnflüssigen, serösen Sekrets normalisiert Ambroxol die Schleimbesechaffenheit und erleichtert so dessen Expektoration (Germouty und Jirou-Najou 1987). In den zilienträgenden Abschnitten fördert es darüber hinaus die mukoziliäre Clearance durch Aktivierung des respiratorischen Flimmerepithels (Weiss et al. 1981).

Ambroxol verstärkt die Synthese von Surfactant-Phospholipiden in der Lunge (Cerutti und Kapanci 1979), (von Wichert et al. 1977). Auch die Surfactant-spezifischen Proteine (SP) sind vermehrt nach Ambroxolgabe im Gesamtlungengewebe nachgewiesen worden. Dabei scheint die vermehrte SP-Expression nach Ambroxol zellspezifisch aufzutreten: In isolierten Typ-2-Pneumozyten war vermehrt SP-C Protein und mRNA nachweisbar, während Clarazellen für die vermehrte Synthese von SP-B verantwortlich sein könnten (Seifart et al. 2005). Die Surfactant-stimulierende Eigenschaft des Ambroxols wird zur Prophylaxe und Therapie des neonatalen Atemnotsyndroms (IRDS) und des dabei auftretenden Surfactantmangels genutzt (Wauer et al. 1989), (Laoag-Fernandez et al. 2000).

### 2.2.2 Anti-inflammatorische Eigenschaften

Ambroxol hemmt die chemotaktische Ansammlung von Entzündungszellen sowie die Freisetzung entzündungsfördernder Mediatoren (Gillissen und Nowak 1998). So produziert eine mit Ambroxol versetzte humane Monozytenkultur nach Endotoxinstimulation weniger IL-1 und Tumornekrosefaktoren (TNF) (Bianchi et al. 1990). Zudem kommt es zu einer Hemmung der pro-inflammatorischen Phospholipase A durch Ambroxol (Gillissen und Nowak 1998).

### 2.2.3 Antioxidative Eigenschaften

Neben den o.g. Funktionen wurden im letzten Jahrzehnt vermehrt antioxidative Eigenschaften des Ambroxols beobachtet. Diese zeigen sich sowohl in einer verminderten Freisetzung als auch in einer verstärkten Eliminierung radikaler Sauerstoffmetabolite. Beispielweise verringert Ambroxol die ROS-Freisetzung aus Alveolarmakrophagen (Winsel 1992) sowie aus poly- und mononukleären Entzündungszellen (Gillissen et al. 1997). Ambroxol wirkt als Radikalfänger, indem es ROS abfängt und eliminiert (Felix et al. 1996), (Nowak et al. 1994), (Hong et al. 2003). Zudem bewirkte die Behandlung mit Ambroxol eine verminderte Beeinträchtigung der  $\alpha$ 1-Antiproteinase nach oxidativem Stress (Lee et al. 2002).

Ambroxol hemmt in vitro die Peroxygenierung von Membranlipiden (Zimmermann und Weber 1991). Diese sog. Lipidperoxygenierung – ein wichtiger Mechanismus in der Toxizität des Ozons (s.o.) – wird auch in vivo durch Ambroxol beeinflusst. Beispielweise bewirkt Ambroxol eine Verminderung der Lipidperoxygenierungs-Reaktionsprodukte (Nowak et al. 1993), (Nowak et al. 1994). Zudem weisen Erythrozyten von Frühgeborenen, deren Mütter in der Schwangerschaft mit Ambroxol behandelt wurden, weniger Lipidperoxydations-Produkte sowie eine verstärkte antioxidative Abwehr auf (Novak et al. 1989).

### 2.2.4 Weitere Eigenschaften

Die protektive und therapeutische Wirkung des Ambroxols wurde vielfach nachgewiesen: Bei am Oberbauch operierten Patienten bewirkten präoperative i.v.-Injektionen von 1g Ambroxol/d ein deutlich vermindertes Auftreten postoperativer

Atelektasen (Mezzetti et al. 1990). Auch der durch das Zytostatikum Bleomycin verursachte Untergang von Lungenepithelzellen und die Einschränkung der Lungenfunktion werden mittels Ambroxol abgeschwächt (Hong et al. 2003), (Moseley et al. 1984). Ambroxol senkt zudem die Inzidenz des akuten Lungenversagens bei Erwachsenen (adult respiratory distress syndrom (ARDS)) (Romanini et al. 1986) und bei Kindern (infant respiratory distress syndrom (IRDS)) (Laoag-Fernandez et al. 2000). Bei Asthmatikern wird durch Ambroxol die bronchiale Hyperreaktivität verringert (Melillo und Cocco 1986). Dieser Effekt wurde auch in einem Tiermodell beobachtet, in welchem Ambroxol bei Hunden die Ozon-verursachte Hyperreaktivität der Atemwege verminderte (Chitano et al. 1989). Beim Menschen kam es unter Behandlung mit Ambroxol zu einer Verbesserung der Lungenfunktionsparameter, Senkung des Antibiotikaverbrauchs, Reduktion der Exazerbationen sowie einer Linderung subjektiver Beschwerden (Winsel 1992), (Ericsson et al. 1987), (Olivieri et al. 1987).

### 2.3 Hitzeschock-Proteine (HSP)

#### 2.3.1 Grundlagen

Die Hitzeschockforschung begann 1962, als F. Ritossa nach Temperaturerhöhung eine bis dahin noch nicht beschriebene Auftreibung in einem Drosophila-Chromosom als Zeichen der vermehrten Transkription dort lokalisierter Gene beobachtete (Ritossa 1962). Diese Gene codieren eine kleine Gruppe von Proteinen, die nach Temperaturanstieg um 5-10°C über Körpertemperatur vermehrt exprimiert und daher Hitzeschock-Proteine (HSPs) genannt werden (Lindquist und Craig 1988). Die nach ihrem Molekulargewicht klassifizierten HSPs lassen sich in nahezu allen Organismen nachweisen - angefangen bei den Prokaryonten bis hin zu den komplexen humanen Eukaryonten. Abgesehen von der Temperaturerhöhung ist ihre Expression durch eine Vielzahl weiterer Stressfaktoren auslösbar, z.B. durch Entzündungen, oxidativen Stress, Ischämie, Schwermetalle, Glucosemangel, Glutamin und Infektionen (Santoro 2000), (DeMaio 1999), (Wischmeyer 2002). Eine vermehrte HSP-Expression findet bereits wenige Minuten nach der Stresseinwirkung statt. Die HSPs erreichen ihre

höchste Konzentration nach ca. 12 Stunden und können bis zu 192 Stunden nach dem Stress-Stimulus vermehrt nachgewiesen werden (Sartori und Scherrer 2003).

Zunächst hielt man die Expression der HSPs nur für ein Zeichen einer akuten Zellschädigung. Später stellte sich jedoch heraus, dass sie zusätzlich einen der umfassendsten Schutzmechanismen darstellen. So sind Zellen, bei denen durch Hitzeschock vermehrt HSPs produziert werden, resistenter gegenüber nachfolgendem und sonst letal wirkendem Stress (Jäätela 1999). Dieses als Stress-Toleranz bezeichnete Phänomen zeigt sich beispielsweise bei Zellen, die durch direkten Gentransfer übermäßig viel HSP (in diesem Fall das HSP 70) exprimieren und daraufhin eine erhöhte Resistenz gegenüber Hyperthermie aufweisen (Li et al. 1991). Darüber hinaus sind Zellen, in denen die HSP 70-Konzentration mittels eines Antikörpers gesenkt wird, verstärkt anfällig gegenüber Hyperthermie (Riabowol et al. 1988). Die HSPs bewirken eine Toleranzentwicklung gegenüber einer Vielzahl weiterer Stress-Faktoren, wie z.B. Tumornekrosefaktoren (Kusher et al. 1990), Stickstoffoxid (NO) (Bellmann et al. 1996), (Hirvonen et al. 1996), UV-Strahlung (Simon et al. 1995), Endotoxine (Xu et al. 1996), (Ribeiro et al. 1994), (Otterbein, et al. 1995), Transplantationskomplikationen (Perdrizet et al. 1993), (Perdrizet et al. 1994) sowie Ischämie (Marber et al. 1995).

### 2.3.2 HSP-Einteilung

Die Stress Proteine lassen sich aufgrund ihres Molekulargewichts in sechs Gruppen bzw. Familien einteilen: die großen HSPs von 100-110kDa, die HSP 90 -, HSP 70-, HSP 60- und HSP 40 Familie sowie die Familie der „kleinen HSPs“ (Jäätela 1999). Im Folgenden werden die in dieser Arbeit relevanten Stress Proteine beschrieben:

#### a) HSP 32

HSP 32 war schon lange vor Entdeckung der Stress-Proteine unter dem Namen Hämoxygenase-1 (HO-1) bekannt (Wong und Wispe 1997). Die HO katalysiert den ersten und limitierenden Schritt im Hämabbau zu Biliverdin, welches dann zu Bilirubin reduziert wird (Choi und Alam 1996). Die Hämoxygenase existiert in den drei Isoformen HO-1, HO-2 und HO-3. Während HO-1 stark induzierbar ist, werden HO-2 und HO-3 konstitutiv (d.h. unter physiologischen Bedingungen) exprimiert

(Otterbein et al. 1999). Die HO-1- (bzw. HSP 32-) Expression wird neben dem Hauptsubstrat Häm auch durch Wasserstoffperoxid, UV-Strahlung, Hyperoxie und Natriumarsenit induziert, die allesamt Auslöser oxidativen Stresses darstellen (Choi und Alam 1996). Die HSP 32 Expression gilt als Schutzfunktion gegenüber oxidativer Schädigung (Lee et al. 1996). Diese protektive Wirkung konnte u.a. gegenüber Hyperoxie-bedingen Lungenschäden in vitro (Lee et al. 1996) und in vivo (Otterbein et al. 1995) nachgewiesen werden.

Es wird postuliert, dass der HSP 32 bedingte Schutz u.a. durch Produkte des Hämabbaus wie Bilirubin und Ferritin zustande kommt. Dabei stellt Bilirubin ein direktes Antioxidanz dar. Ferritin hingegen wirkt als indirektes Antioxidanz, indem es freies Eisen (notwendig zur Bildung oxidativ wirkender Radikale) bindet (Wong und Wispe 1997). Auch der Hämabbau selbst scheint zur Schutzfunktion gegenüber oxidativer Schädigung beizutragen. So wurde nachgewiesen, daß freies Häm einen potenten Katalysator der Lipidperoxidation – ein wichtiger Mechanismus in der Ozontoxizität - darstellt (McCormic et al. 2003).

#### b) HSP 70 und HSC 70

Die HSP 70 Familie ist die am ausführlichsten untersuchte HSP-Gruppe (Wong und Wispe 1997). Von den vier Mitgliedern dieser Familie werden folgend die für diese Arbeit relevanten Proteine HSP 70 und HSC 70 (auch HSP 72 und HSP 73 genannt) besprochen. Während HSC 70 als konstitutive Form nach Stresssituationen nicht oder nur sehr geringfügig produziert wird, stellt das HSP 70 (HSP 72) die durch Stress induzierbare Form dar. Beide Stress-Proteine sind im Zytosol und im Zellkern lokalisiert und agieren dort als molekulare Chaperone (DeMaio 1999). Diese Chaperone (chaperone (engl.) = Anstandsdame) spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellfunktionen. Sie assistieren bei der Faltung neu entstehender Proteine, der Bildung von Multiproteinkomplexen sowie beim Transport von Proteinen durch die Zellmembran (Jäättela 1999). Bei der Einwirkung von Stress (z.B. in Form von Hitze) fallen vermehrt denaturierte Polypeptide an. Diese können durch HSP 70 in ihre ursprüngliche Form zurückgeführt werden. Dadurch wird die Anhäufung dieser Abfallprodukte und ein eventuell daraus folgender Zelluntergang verhindert (Wong und Wispe 1997). Die durch Hitze inaktivierte RNA-Polymerase

wird beispielsweise mit Hilfe von HSP 70 wieder aktiviert und kann somit ihre essentielle Funktion weiter ausüben (Skowrya et al. 1990).

Mehrere Fakten weisen auf eine hohe Bedeutsamkeit des HSP 70 Proteins für den Zellschutz nach zellulärem Stress hin: Zum einen ist die HSP 70 Struktur während der Evolution weitestgehend erhalten geblieben und kann daher in ähnlicher Form in nahezu allen Lebewesen nachgewiesen werden (Santoro 2000). Zum anderen ist die RNA-Polymerase funktionsbereit am Anfang des HSP 70 Gens lokalisiert. Die Transkription des HSP 70 Protein kann also im Falle einer Zellschädigung ohne Verzögerung beginnen (Fernandes et al. 1994). Zudem besitzt das HSP 70 Gen keine Introns. Da somit keine Zeit für aufwendiges Splicing verschwendet wird, liegt das HSP 70 Protein schneller funktionsbereit vor (DeMaio 1999).

Denaturierte Proteine stellen den eigentlichen Auslöser der HSP 70 Stressantwort dar. Dabei erscheinen hydrophobe Anteile, die normalerweise im Inneren des Proteinmoleküls verborgen sind, auf der Moleküloberfläche (Morishima 2005). Unter physiologischen Bedingungen ist HSP 70 an einen Transkriptionsfaktor - den Hitzeschock-Faktor (HSF) – gebunden (siehe Abb. 2.1). In dieser Bindung liegt HSF als inaktives Monomer vor (Wong und Wispe 1997). Häufen sich allerdings infolge zellulären Stresses vermehrt denaturierte Proteine an, löst sich HSP 70 aus diesem Komplex, um seine Funktion bei der Faltung denaturierter Polypeptide auszuüben. Der freigewordene HSF kann nun ein aktives Trimer bilden und so die Transkription des HSP 70 Gens initiieren (Santoro 2000). Sobald genügend HSP 70 vorhanden ist, um HSF wieder in den inaktivierten Zustand zu versetzen, kommt die Transkription zum Erliegen (Wong und Wispe 1997). HSP 70 hat demnach nicht nur eine zytoprotektive, sondern auch eine regulatorische Funktion. Diese These wird durch eine Studie von Ananthan et al. gestützt, in welcher eine Injektion von denaturierten Proteinen in Froschoozyten eine vermehrte HSP 70 Expression bewirkte (Ananthan et al. 1986).

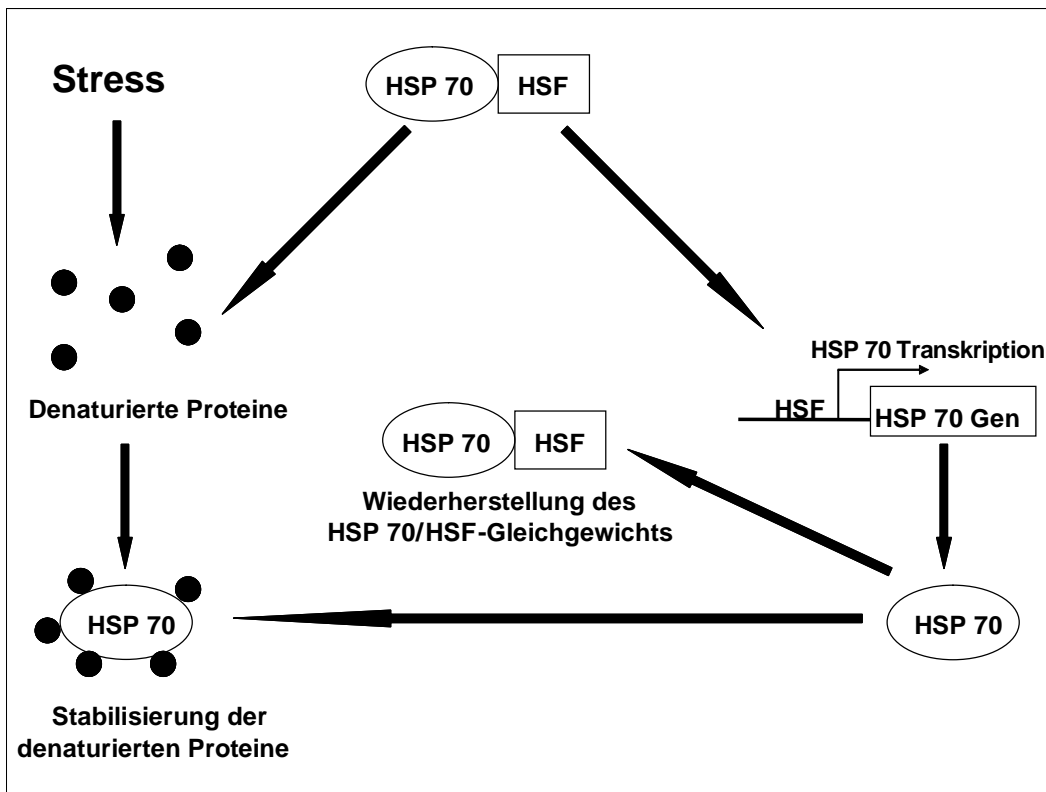


Abbildung 2-1: Auslösung einer HSP 70-Antwort durch vermehrtes Auftreten denaturierter Proteine mit nachfolgender Aktivierung des heat shock factors (HSF) und Initiierung der Transkription. Mod. nach Wong et al. (Wong and Wispe 1997).

HSP 70 scheint zudem eine entscheidende Rolle bei der Apoptose zu spielen. Die Apoptose stellt den kontrollierten Mechanismus des Zelltods dar, der insbesondere über eine Familie von Cystinproteasen – den Caspasen – reguliert wird (Degterev 2003), (Morishima 2005). Da die Caspasen als inaktive Vorstufen gebildet werden, ist zunächst deren Aktivierung notwendig. Mehrere Studien zeigten, dass HSP 70 die Aktivierung der Caspase-9 inhibiert (Beere et al. 2000), (Saleh et al. 2000), (Li et al. 2000) und gaben Anlass zu der Hypothese, dass HSP 70 die Apoptose durch Interaktion mit Caspase regulieren könnte (Morishima 2005), (Mayer und Bukan 2005), (Villar und Mendez-Alvarez 2003). Tatsächlich vermindert eine Vorbehandlung mit Hyperthermie die Apoptoserate (Wang et al. 1999). Zudem wurde die Inhibition der Apoptose durch die vermehrte Expression von HSP 70 mehrfach nachgewiesen (Wang et al. 1999), (Gabai et al. 1998), (Jäättelä et al. 1998).

c) HSP 60

HSP 60 (auch Chaperonin genannt) ist in den Mitochondrien sowohl prokaryotischer als auch eukaryotischer Zellen lokalisiert (Soltys und Gupta 1996). Wie auch die HSP 70 Familie übt es eine Funktion als molekulares Chaperon aus. In Mitochondrien eukaryotischer Zellen bildet HSP 60 mit HSP 10 einen Komplex in Form eines „Doppel-Doughnuts“, bindet direkt an ungefaltete Proteine und katalysiert anschließend deren Faltung und/oder die Bildung von Proteinkomplexen (Minowada und Welch 1995), (Voos und Rottgers 2002), (Di Felice et al. 2005).

HSP 60 scheint – wie auch HSP 70 – eine Rolle in dem Mechanismus der Apoptose, zu spielen. So führte eine verstärkte HSP 60-Expression in Herzmuskelzellen zu einem geringeren Ausmaß der Hypoxie-bedingten Apoptose (Lin et al. 2001). Zudem wurde in Zellen mit verminderter HSP 60-Expression eine verstärkte Apoptoserate beobachtet (Kirchhoff et al. 2002), (Gupta und Knowlton 2005). Allerdings sind auch pro-apoptotische Eigenschaften des HSP 60 beschrieben: Beispielsweise zeigten Samali et al. auf, dass HSP 60 die Aktivierung der Caspase-3 (einem Schritt in der Apoptosekaskade) beschleunigte (Samali et al. 1999). Somit könnte HSP 60 sowohl pro- als auch anti-apoptotische Funktionen erfüllen, möglicherweise abhängig von der Zellart und/oder dem auslösenden Faktor für die Apoptose (Gupta und Knowlton 2005).

Bakterielles HSP 60 hingegen scheint im humanen Gewebe immunologische Reaktionen hervorzurufen. Diese werden mit Infektionen, Autoimmun- und Prionen-Erkrankungen sowie mit idiopathischen, multifaktoriellen Krankheiten wie Arthritis oder Atherosklerose in Zusammenhang gebracht (Ranford und Henderson 2002).

### 2.3.3 HSP in der Lunge

Eine gesteigerte HSP-Expression nach zellulärem Stress wurde in verschiedenen Zellen der Lunge nachgewiesen, beispielsweise in Bronchialepithelzellen (Wong et al. 1997), Alveolarmakrophagen, Trachealepithelzellen (Cohen et al. 1991) sowie Endothelzellen pulmonaler Arterien (Rinaldo et al. 1990). Bonay et al. stellten mittels immunhistochemischer Färbemethoden in situ die HSP-Verteilung der Lunge dar.

Während HSP 70 in Alveolarmakrophagen und Epithelzellen proximaler Bronchiolen (terminale Bronchiolen) stark exprimiert wurde, war im Epithel distalerer Bronchiolen (respiratorische Bronchiolen) größtenteils keine HSP 70 Expression nachweisbar. Auch in Typ 1- und Typ 2 Pneumozyten konnte keine HSP 70 Expression festgestellt werden (Bonay et al. 1994). In der Zell-Linie A549, die ursprünglich aus humanem Adenokarzinomgewebe der Lunge stammt und in Studien repräsentativ für distale pulmonale Epithelzellen verwendetet wird ist hingegen eine HSP 70-Expression beobachtet worden. Allerdings handelte es sich dabei um rekombinante Zellen, in denen durch ein Plasmid HSP 70 cDNA in die Zellen eingeschleust wurde (Wong et al. 1998). Brandes et al beobachteten in Typ 2 Pneumozyten von Hasen eine durch die Zellisolation verursachte Expression von Proteinen. Diese ähnelten in der Halbwertszeit sowie dem molekularen Gewicht einigen Stressproteinen. Zudem konnten diese Proteine auch durch vorherige Hyperthermie induziert werden. Daher vermuteten Brandes et al., dass es sich hierbei um eine Stress-Antwort handeln könnte, allerdings konnte ein genauer HSP-Typ nicht klassifiziert werden (Brandes und Finkelstein 1989).

Die HSP-Expression der Lunge wird durch unterschiedliche Stress-Faktoren ausgelöst. Beispielweise bewirkt Hyperthermie bei kultivierten Alveolarmakrophagen, Bronchialepithel-, und Endothelzellen (in vitro) eine gesteigerte HSP 70 Expression (Cohen et al. 1991), (Rinaldo et al. 1990). Natriumarsenit-Gabe löst ebenfalls eine vermehrte HSP 70 Bildung aus (in Bronchialepithelzellen und pulmonalen Endothelzellen) (Cohen et al. 1991), (Wong et al. 1996). Einige Stressfaktoren, die in anderen Organen HSP induzieren, verursachen in bestimmten Lungenkompartimenten keine HSP-Erhöhung. Beispielsweise bewirken Endotoxine im Darm- und Herzgewebe sowie in Fibroblasten eine verstärkte HSP 70-Expression, in pulmonalen Endothelzellen ist jedoch keine Endotoxin-induzierte HSP 70 Erhöhung feststellbar. Auch Oxidantien wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Ozon lösen bei Trachealepithelzellen und Alveolarmakrophagen keine vermehrte HSP 70 Expression aus (Cohen et al. 1991). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass sich die HSP Induktoren der Lunge von denen anderer Organe unterscheiden. Zudem scheint die HSP Antwort der Lunge von den einzelnen Stressfaktoren abhängig zu sein (Wong und Wispe 1997).

Bei einigen Lungenerkrankungen sind Veränderungen der HSP-Expression zu beobachten. So ist in Alveolarmakrophagen sowie Bronchialepithelzellen von Asthmatikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine vermehrte HSP 70 Bildung nachweisbar. Diese korreliert sowohl mit dem Ausmaß der Erkrankung als auch mit der Menge eosinophiler Leukozyten in der BAL (Vignola et al. 1995). Auch bei ARDS-Patienten zeigt sich in Alveolarmakrophagen eine verstärkte HSP 70-Expression (Kindas-Mügge et al. 1996).

### 2.3.4 Stress-Toleranz der Lunge

Verschiedene Zellen der Lunge, in denen durch bestimmte Faktoren eine HSP Antwort induziert worden ist, sind resistenter gegenüber nachfolgendem Stress. Beispielsweise sind pulmonale Endothelzellen, die durch Hitze und Natriumarsenit vermehrt HSP 70 exprimieren, weniger anfällig gegenüber Endotoxin-verursachter Apoptose (Wong et al. 1996). Stress-Proteine bewirken auch einen Schutz gegenüber oxidativ-wirkenden Substanzen. So weisen Lungenendothelzellen und Alveolarmakrophagen nach HSP 70 Induktion (durch Hitze) eine verstärkte Resistenz gegenüber  $H_2O_2$  auf (Wang et al. 1996). Des Weiteren zeigen HSP 32-überexprimierende Lungenepithelzellen eine geringere Anfälligkeit gegenüber Hyperoxie (Lee et al. 1996).

Die zytoprotektive Wirkung der Stress-Proteine ist auch in vivo zu beobachten. Ratten, bei denen durch Temperaturerhöhung vermehrt HSP 70 exprimiert wird, zeigen eine geringere Mortalität bei Phospholipase A- (Villar et al. 1993) und Endotoxin-induzierter Lungenschädigung (Villar et al. 1994), (Koh et al. 1999). Dabei bewirkte die HSP-Stressantwort auch dann einen protektiven Effekt, wenn sie erst nach der Endotoxingabe durch Temperaturerhöhung induziert wurde (Ribeiro et al. 1996). Die durch Ischämie und Reperfusion verursachte Beeinträchtigung der Lunge kann mittels vorheriger HSP 70 Induktion begrenzt werden (McCormic et al. 2003), (Javadpour et al. 1998). Die protektive Wirkung des HSP 32 (Hämoxigenase-1) in der Lunge wurde ebenfalls nachgewiesen: So bewirkte eine verstärkte HSP 32-Expression bei Ratten eine verminderte Anfälligkeit gegenüber Endotoxin (Otterbein et al. 1995) sowie ein

vermindertes Auftreten von Apoptose in der Lunge durch Hyperoxie (Otterbein et al. 1999), (Ryter und Choi 2005).

Nach LoCicero et al. üben die Hitzeschock-Proteine zudem eine regulierende Funktion in der Endotoxin-bedingten Entzündungskaskade aus. Diese These stützt sich auf die Beobachtung, dass eine vorherige HSP 70-Induktion (durch Natriumarsenit) eine deutliche Verminderung des Endotoxin-verursachten IL-1-Anstieges in Rattenlungen bewirkt (LoCicero et al. 1999). Eine vermehrte HSP 32-Expression verringerte zudem den Anstieg der Zytokine TNF  $\alpha$  und IL-1 in Makrophagen (Otterbein et al. 2000). Der anti-inflammatorische Effekt durch vorherige Stressinduktion konnte auch bei einem Model für ventilationsbedingte Lungenschädigungen gezeigt werden. Dabei verursachten hohe Beatmungsvolumina bei zuvor mit Hyperthermie behandelten Lungen einen geringeren Plasmaanstieg von TNF  $\alpha$  und IL-1 (Ribeiro et al. 2001), (Villar und Mendez-Alvarez 2003).

### 2.3.5 HSP in der Lunge nach Ozonexposition

Ozon ist als oxidative Substanz ein potenter Auslöser einer Stress-Antwort. Im Lungengewebe differieren die bisherigen Untersuchungsergebnisse jedoch zwischen in vivo- und in vitro Exposition: Cohen et al. konnten beispielsweise nach einstündiger in vitro Exposition von Trachealepithelzellen und Alveolarmakrophagen (Meerschweinchen) mit 0.05 bzw. 0.2ppm Ozon keine Erhöhung des HSP 70 und HSC 70 nachweisen (Cohen et al. 1991). Auch bei den Expositionen einer humanen Bronchialepithelzelllinie (0.1 und 1ppm Ozon) (Sun et al. 1994) bzw. tracheobronchialer Epithelzellen von Affen (1ppm Ozon für 90 Minuten) (Wu et al. 1999) war keine vermehrte HSP 70 Expression feststellbar.

Bei in vivo-Exposition hingegen werden verstärkte HSP-Expressionen beobachtet. So erfassten Takahashi et al. nach bis zu 7tägiger Ozonexposition (0,4ppm) eine Erhöhung von HSP 32 m-RNA im Ratten-Gesamtlungengewebe (Takahashi et al. 1997). Diese war ab Tag 3 der Exposition signifikant und stieg bis zum Tag 7 kontinuierlich an. Cosma et al. hingegen stellten in vivo nach 6stündiger Exposition von 0.5 bzw. 1ppm Ozon keine Erhöhung der HSP 32 m-RNA in Rattenlungen fest

(Cosma et al. 1992). Das unterschiedliche Ergebnis im Vergleich zu Takahashi et al. könnte durch eine erst nach längerer Ozonexposition (3 Tage vs. 6 Stunden) einsetzenden HSP 32 m-RNA Erhöhung erklärt werden (Takahashi et al. 1997).

Bezüglich der HSP 70 Expression nach in vivo Ozonexposition sind gegensätzliche Ergebnisse beschrieben worden: Bei Wirth et al. bewirkte 1 bzw. 2ppm O<sub>3</sub> (über 5 Stunden) in Mäuselungen keine HSP 70 Erhöhung (Wirth et al. 2002). Eine Studie von Su et al. hingegen zeigte eine signifikant verstärkte HSP 70 Expression nach 6stündiger Exposition von Meerschweinchen mit 0,4 bzw. 0,66ppm Ozon. Diese war sowohl in der bronchoalveolären Lavage (BAL) als auch im zuvor lavagierten Gesamtlungengewebe zu beobachten (Su und Gordon 1997). In der BAL erreichte HSP 70 seinen Maximalwert 24h nach Exposition und fiel nach weiteren 24h wieder nahezu auf den Normalwert ab. Im Gesamtlungengewebe war HSP 70 auch noch 72h nach Ozonexposition signifikant erhöht. Die konstitutive Form HSC 70 zeigte im gleichen Versuch keine Veränderung gegenüber den Kontrollen (Su und Gordon 1997).

Für die unterschiedliche HSP-Expression in vivo und in vitro sind folgende Erklärungen denkbar: Da die HSP-Expression in vitro anscheinend nicht durch Ozon beeinflusst wird (s.o.), könnte es sich bei dem HSP-Anstieg in vivo um einen indirekten Mechanismus handeln (Su und Gordon 1997). In vivo entstehen durch Reaktion des Ozons mit dem die Atemwege auskleidenden LLF – und daraus resultierender Peroxygenierung ungesättigter Fettsäuren (Lipidperoxygenierung) – toxische Sekundärprodukte (z.B. Wasserstoffperoxid und Aldehyde) (Pryor und Church 1991). Diese könnten den eigentlichen Auslöser für die HSP-Expression in vivo darstellen (Hamilton et al. 1998). Eines der gebildeten Aldehyde ist das 4-Hydroxynoneal (HNE). Die auf zellulärer Ebene toxische Substanz wurde in der Lunge nach Ozonexposition nachgewiesen (Hamilton et al. 1996), (Kirichenko et al. 1996). Hamilton et al. exponierten in vitro Alveolarmakrophagen mit HNE und stellten daraufhin einen Anstieg von HSP 70, HSP 32 und HSP 65 fest (Hamilton et al. 1998), (Hamilton et al. 1996). Diese Beobachtungen stützten die Vermutung, dass die Zellschädigung und HSP-Expression nach Ozonexposition u.a. durch

Lipidperoxidation mit nachfolgender Aldehydbildung (wie z.B. HNE) zustande kommt (Hamilton et al. 1998).

Die Auswirkung chronischer Ozonexposition auf die HSP-Expression wurde von Wong et al. untersucht. Sie setzten Ratten über einen Zeitraum von 40 Wochen diskontinuierlich 0.15ppm Ozon aus und stellten daraufhin einen vermehrten Gehalt von HSP 70 im Gesamtlungengewebe fest (Wong et al. 1996). Wie bereits in Kap. 2.1.5 beschrieben, stellt sich bei wiederholter Ozonexposition eine Toleranz gegenüber der toxischen Ozonwirkung ein. Interessanterweise wurde auch eine verminderte HSP-Expression durch Ozon beobachtet: Wu et al. setzten Affen 1 bzw. 90 Tage für je 8h Ozon (0,98ppm) aus und untersuchten durch immunhistochemische Anfärbung die Verteilung der Stress-Proteine. Die Lungen der Tiere mit kurzer Ozonexposition (1d) zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine verminderte HSP 70-Anfärbung. Nach längerer Ozonexposition (90d) war diese Verminderung der HSP 70-Dichte noch stärker ausgeprägt. Ähnliche Beobachtungen erfolgten bei HSC 70 und HSP 60 (Wu et al. 1999). Wu et al. erklärten den Gegensatz zu der O<sub>3</sub>-bedingten HSP-Erhöhung der oben genannten Studien damit, dass evtl. andere Zellen als die Lungeneithelien für den HSP-Anstieg durch Ozonexposition verantwortlich seien. So könnten z.B. Entzündungszellen maßgeblich zu einer verstärkten HSP-Expression beitragen, die möglicherweise bei der Lungenpräparation und -fixation herausgewaschen wurden und somit durch Wu et al nicht anfärbbar waren (Wu et al. 1999).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Ozonexposition

##### 3.1.1 Versuchsaufbau

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Wiga GmbH, Salzfild, Deutschland) mit einem Gewicht von ca. 200g verwendet. Jeweils sechs Ratten wurden einer artifiziiellen Ozonatmosphäre mit folgenden Konzentrationen und Expositionszeiten ausgesetzt:

- 8 Stunden mit 1,5ppm Ozon (8h 1,5ppm)
- 8 Stunden mit 3ppm Ozon (8h 3ppm)
- 12 Stunden mit 0,6ppm Ozon (12h 0,6ppm)
- 24 Stunden mit 0,6ppm Ozon (24h 0,6ppm)

Parallel dazu wurden sechs weitere Ratten je Gruppe zusätzlich mit Ambroxol behandelt (Mukosolvan®, 75mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal). Die Ambroxol-Applikation fand bei allen Gruppen 12h vor sowie bei Beginn der Ozonexposition und bei der 24h-Gruppe zusätzlich 12h nach Expositionsbeginn statt. Des Weiteren wurde sechs Ratten pro Gruppe Ambroxol appliziert, die anstelle von Ozon für die gleiche Zeitspanne Normalluft ausgesetzt waren. Als Kontrollen wurden sechs raumluftexponierte Ratten verwendet. Somit entstanden folgende Gruppen:

	Ozon	Ozon + Ambroxol	Ambroxol
8h	8h 1,5ppm	8h 1,5ppm + A.	8h A.
	8h 3ppm	8h 3ppm + A.	
12h	12h 0,6ppm	12h 0,6ppm + A.	12h A.
24h	24h 0,6ppm	24h 0,6ppm + A.	24h A.

### 3.1.2 Aufbau der Expositionsanlage

Zur Herstellung der ozonhaltigen Atmosphären wurde ein Ozongenerator (Hersteller siehe Liste in Kap. 6.1) verwendet und die erwünschte Konzentration durch Verdünnung mit Pressluft hergestellt. Diese Gasgemische wurden mit einem Flow von 15l/min in PVC-Expositionskammern mit 72l Inhalt eingeleitet und mittels eines Ventilators innerhalb der Kammern verwirbelt. Durch selektive photometrische Ozonmessung konnte der Ist-Wert überprüft und bei Bedarf auf den Sollwert korrigiert werden. In den Expositionskammern herrschten eine konstante Temperatur von 22°C sowie eine Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Innerhalb der Expositionsphasen erhielten die Tiere Futter und Wasser ad libitum. Die Tierexperimente wurden gemäß der Helsinki Konventionen (Helsinki convention for the use and care of animals) durchgeführt.

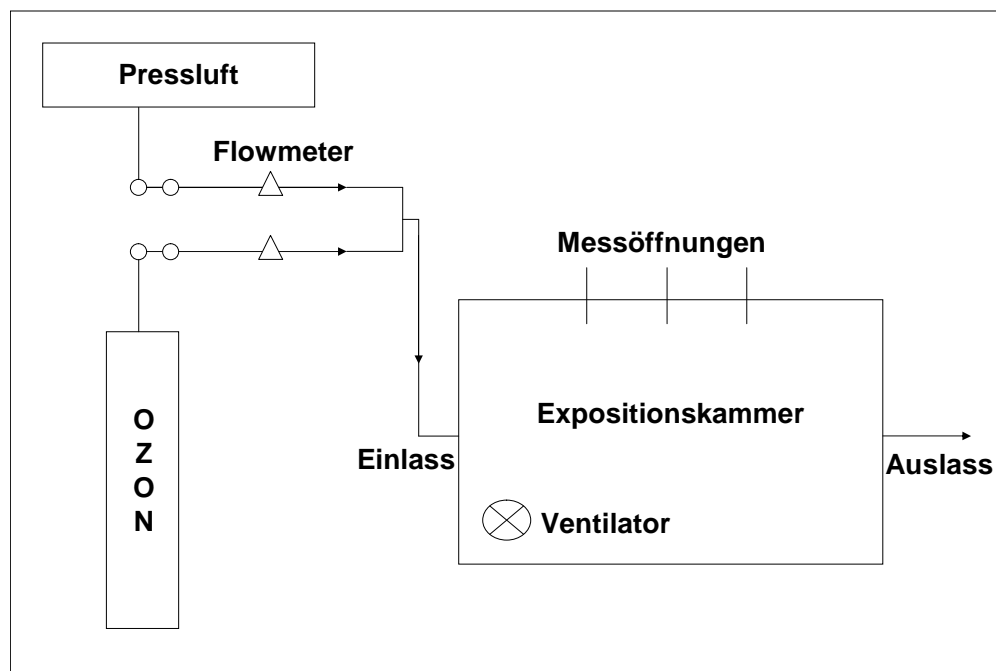


Abbildung 3-1: Aufbau der Expositionsanlage (mod. nach Schäfer(Schäfer 1990))

### 3.1.3 Operation und Lungen-Präparation

Im Anschluss an die Exposition wurden die Ratten durch intraperitoneale Injektion von Phenobarbital-Natrium (0,09mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Um einer intravasalen Gerinnung vorzubeugen erhielten die Tiere in einer simultanen Injektion Heparin-Natrium. Nach Fixierung der narkotisierten Tiere auf einem Operationsbrett mittels Gummibänder wurde das Abdomen und anschließend die abdominale Aorta eröffnet. Daraufhin erfolgte die Intubation der Trachea mittels einer Trachealkanüle. Durch Inzision des Zwerchfells kollabierte die Lunge, die anschließend durch mediane Thorakotomie dargestellt und über die Trachealkanüle ventiliert wurde (dreimal mit je 7ml Raumlufte). Anschließend wurde der linke Ventrikel eröffnet und ein Kunststoffkatheter in den Truncus pulmonalis eingeführt. Über diesen erfolgte die Perfusion der Lunge mit temperierter isotoner Kochsalzlösung (37°C, pH 7, hydrostatischer Druck von 20cm Wassersäule). Dabei konnte das Perfusat durch Eröffnung des linken Atriums entweichen. Gleichzeitig wurde die Lunge fünfmal mit je 5ml Luft hyperventiliert. Auf diesem Weg erhielt man eine nahezu blutleere Lunge. Diese wurde zusammen mit dem Herzen entnommen und mit Kochsalzlösung achtmal bis zur totalen Lungenkapazität (ca. 8ml) lavagiert. Nach Entfernung des umliegenden Gewebes wurden die Lungen in Eppendorf-Cups portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## 3.2 Gewebeaufarbeitung und Isolierung

### 3.2.1 Protein-Isolierung

Die gefrorenen Lungenstücke wurden gewogen und mit Hilfe von autoklavierten und in flüssigem Stickstoff gefrorenen Mörsern und Pestillen zu einem feinen Mehl verarbeitet. Anschließend erfolgte die Lösung des Pulvers in 54% Harnstoffpuffer (500µg Gewebe/1,5ml Harnstoffpuffer). Das gelöste Gewebe wurde daraufhin mittels einer Kanüle zu einer homogenen Flüssigkeit geschert, in Eppendorf-Cups verteilt, abzentrifugiert (3min bei 8000U/min) um den Zellwandschrott zu entfernen und der Überstand bei -20°C aufbewahrt. Die Bestimmung des Proteingehalts jeder Probe erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit® (für Hersteller siehe Tabelle in Kap. 6.2) nach der dort angegebenen Methode. Dabei wurde für jede Probe eine

Doppelbestimmung durchgeführt. Die Proben, die später in dem gleichen Elektrophorese-Gel laufen sollten, wurden auch gemeinsam in einer Proteinbestimmung gemessen.

### 3.2.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des Trizol®-Reagenz. Die Arbeitsschritte entsprachen dabei den Vorgaben des Herstellerprotokolls. Anschließend wurden 1µl RNA-Probe auf 1ml A. dest. verdünnt und RNA-Gehalt und Reinheit mittels photometrischer Bestimmung (UV Licht mit 260 und 280nm) bestimmt. Die RNA-Konzentration der einzelnen Proben (in µg/µl) ergab sich dann aus der optischen Dichte multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor. Bei der Handhabung von RNA wurde möglichst RNase-frei gearbeitet. Zusätzlich zu den üblichen labortechnischen Maßnahmen (Arbeiten stets unter Verwendung von Handschuhen, autoklavierten Puffern und sterilem Wasser) wurden RNase-freie Eppendorf-Cups verwendet, Kunststoffe 1h in 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gereinigt und Glasgeschirr zur Minimierung der RNase-Aktivität hitzesterilisiert (15h bei 275°C).

### 3.2.3 c-DNA-Synthese

Da die in der PCR verwendete Polymerase nur DNA vervielfältigt (siehe Kap.3.4), musste zunächst die RNA in DNA umgeschrieben werden. In der c-DNA-Synthese wurden dazu unter Eiskühlung 2µg isolierte RNA mit 2µl Oligo dT versetzt, mit A. dest. auf 11µl aufgefüllt und 10min bei 70°C denaturiert. Danach wurden die Proben sofort wieder auf Eis gestellt und pro Probe folgende Substanzen beigefügt:

---

A. dest.	14,5µl
Nukleotid-Mix (dNTP-Mix, je 10mM)	2µl
5xRT-Puffer	8µl
DTT (0,1M)	4µl
Reverse Transkriptase (200U/µl)	0,5µl

---

Dieser Versuchsansatz inkubierte 70min bei 37°C und denaturierte anschließend 10min bei 94°C. Die so entstandene c-DNA wurde durch eine Kontroll-PCR mit GAPDH-Primern überprüft (siehe Kap.3.4) und bei -20°C aufbewahrt.

### 3.3 Western Blot

#### 3.3.1 Grundlagen

Der Western- bzw. Immunoblot ist eine häufig angewendete Methode zum selektiven Nachweis von Proteinen. Er wird in vier Schritte unterteilt (Masseyeff 1993):

- Gelelektrophorese zur Auftrennung des Proteingemisches
- Proteintransfer vom Gel auf eine Membran
- Blocken nichtspezifischer Bindungsstellen
- Detektion der transferierten Proteine

Das in der Gelelektrophorese verwendete Gel entsteht durch die Polymerisation von Polyacrylamid, bei welcher Ammoniumpersulfat als Auslöser und TEMED (Tetramethylethylenediamine) als Katalysator fungieren. Durch Änderung der Acrylamidkonzentration des Gels kann dessen Porengröße variiert werden. Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren liefert aufgrund eines Sprunges der Acrylamidkonzentration besonders scharfe Banden. Im oberen Gel, dem sog. Sammelgel, werden die Proteine bei niedriger Acrylamidkonzentration zu einer schmalen Bande konzentriert. Anschließend erfolgt im unteren Trenngel bei höherer Acrylamidkonzentration die Protein-Auftrennung. Die Wanderung eines Proteins im elektrischen Feld hängt sowohl von der Ladung als auch von der Molekularmasse ab. Um eine nahezu ladungsunabhängige Auftrennung eines Proteingemisches zu erhalten, wird die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt: Durch die Verwendung von SDS (Natriumdodecylsulfat) werden die Proteine von einer stark negativen Ladung umgeben. So entstehen Partikel mit relativ konstantem Verhältnis von Ladung zur Masse, deren Wanderung im Gel nun nicht mehr von der

Eigenladung sondern nur noch von der Molekulargröße und -form abhängig ist. Nach Beendigung der Gelelektrophorese kann die im Gel zurückgelegte Strecke mit der eines Markers verglichen und so die Molmasse der einzelnen Proteine bestimmt werden (Pühler und Regitz 2000). Um eine haltbare Kopie des SDS-Gels zu erhalten, werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Semi-Dry-Verfahren werden dabei das Gel und die Membran zwischen feuchte Filterblätter eingebettet und zwischen zwei Graphitplatten gelegt. Die Übertragung erfolgt dann mittels einer an den Graphitplatten angelegten Spannung (Masseyeff 1993). Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen bei der Detektion werden die noch freien Stellen auf der Membran mit Rinderalbumin (BSA) geblockt. Die Detektion der transferierten Proteine erfolgt dann mit Hilfe korrespondierender Antikörper (AK). Dabei kommen zunächst der Erstantikörper (in diesem Fall HSP-AK) und anschließend der gegen den Erstantikörper gerichtete Zweitantikörper (Anti-HSP-AK) zur Anwendung. Der Zweitantikörper ist mit alkalischer Phosphatase konjugiert. Durch die Zugabe von Phosphat-Substrat erfolgt ein Farbumschlag und die Bande wird sichtbar (s. Abb. 3-2).

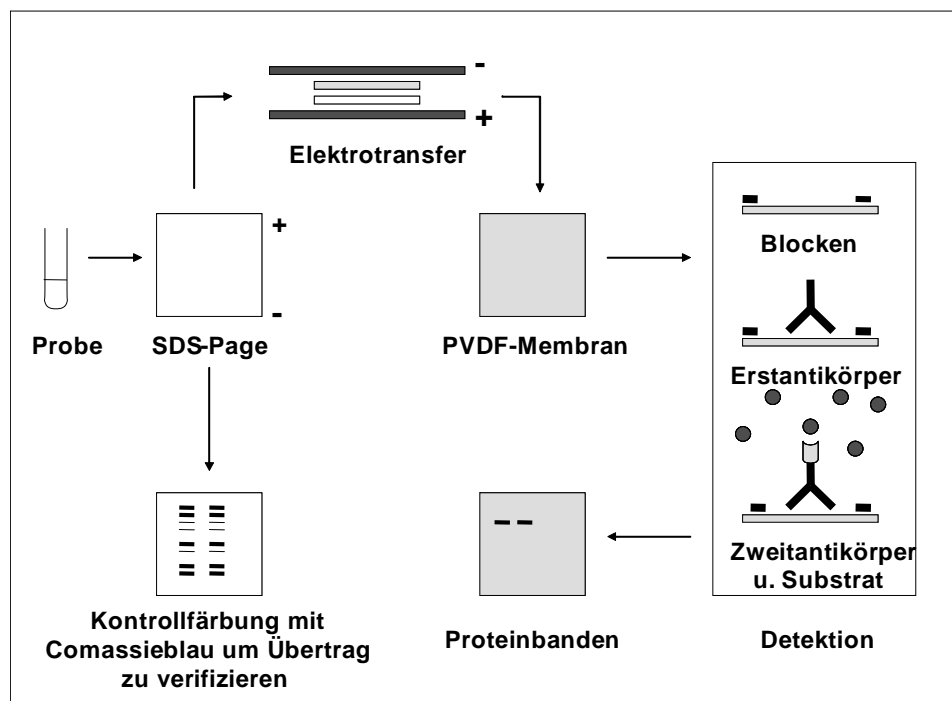


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des Western Blots

In der vorliegenden Arbeit wurden auf einem Gel jeweils zwei Proben der Gruppen der 1)alleinigen Ozonexposition, 2)Ozonexposition mit Ambroxol und 3)alleinigen Ambroxolgabe untersucht. Dieser Aufbau wurde jeweils dreimal wiederholt, sodass alle sechs Proben einer Gruppe verwendet wurden.

### 3.3.2 Durchführung

#### a) Gelzubereitung

Zuerst erfolgte die Herstellung des Trenngels. Dazu wurden folgende Lösungen auf Eis zusammenpipettiert, das Gel vertikal zwischen eine Glas- und Aluminiumplatte gegossen und zwecks Luftabschluss mit Isopropanol überschichtet.

#### Zusammensetzung eines Trenngels:

---

Solution 1 (Rotiphorese 30® (30% Acrylamid, 0,8% Bis-Acrylamid))	2,25ml
Solution 2 (1,5M Tris-Base, 8mM EDTA, 0,4%SDS, pH 8,8)	1,4ml
A. dest.	1,95ml
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	37,5µl
TEMED	3,75µl

---

Nach 30minütiger Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen, das kurz zuvor angesetzte Sammelgel auf das Trenngel aufgetragen und für weitere 30 Minuten zur Polymerisation stehengelassen. Die Probestaschen entstanden dabei durch Einbringen eines Kunststoffkamms in das noch flüssige Gel.

#### Zusammensetzung eines Sammelgels:

---

Solution 1	0,6ml
Solution 3 (0,5M Tris-HCl, 8mM EDTA, 0,4%SDS, pH 6,8)	1,0ml
Aqua dest.	1,7ml
APS 10%	25µl
TEMED	5µ

---

b) Probenvorbereitung und Gelelektrophorese

Zunächst wurden 10µg Proteinprobe mit A. dest auf 5µl aufgefüllt und mit 5µl Dissoziationspuffer (30mM Tris-HCl (pH 7,4), 15%Glycerin, 10% 2-Mercaptoethanol, 3%SDS, 0,04% Bromphenolblau) versetzt. Diese Ansätze wurden 3min bei 95°C denaturiert und anschließend in das in eine Elektrophoresekammer eingespannte und mit Laufpuffer (1,5%Glycerin, 0,5%Tris-Base, 0,15%SDS, pH 8,6) aufgefüllte Gel pipettiert. Als Marker kamen 5µl des Rainbow-Markers zur Anwendung. Anschließend lief das Gel 30min bei 25mA und weitere 30min bei 50mA.

c) Proteintransfer

Vorbereitend wurden die Graphitplatten mit A. dest. eingeweicht und Membran und Filterpapiere auf Größe des Gels zurechtgeschnitten. Anschließend wurden sechs Filterpapiere mit Blotpuffer A (50mM Borsäure (pH9), 20%Methanol) und weitere sechs mit Blotpuffer B (50mM Borsäure, 5%Methanol) angefeuchtet. Die kurz in Methanol eingetauchte Membran inkubierte 15min in Blottpuffer A. Dann wurde der Blot luftblasenfrei aufgebaut:

Blotaufbau:

---

Kathode ( - )

Filterpapiere (Blotpuffer B)

Gel (nur Trenngel)

Membran

Filterpapiere (Blotpuffer A)

Anode ( + )

---

Der Elektrotransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8mA/cm<sup>2</sup> über 2 Stunden. Danach wurde die Membran entnommen und zwecks Blockierung unspezifischer Bindungen über Nacht bei 4°C in 5%BSA (in TBS-Puffer (10mM Tris-Base, 0,15M NaCl)) inkubiert. Zur Überprüfung eines gleichmäßigen Proteinauftrags wurde das Gel

10min in Coomassie-Blau-Lösung (1g Coomassie-Blue, 400ml Methanol, 100ml Eisessig, 500ml A.dest.) gefärbt und über Nacht in Entfärberlösung (30%Methanol, 10%Eisessigsäure) entfärbt.

### d) Detektion

Zunächst wurden die Erstantikörper (anti-HSP) in 3% BSA (in TBS) verdünnt (HSP 60 1:2000, HSP 32 1:1000, HSP 70 1:20.000 und HSC 70 1:1000). Die mit TBS gewaschene Membran inkubierte eine Stunde in der Antikörperlösung und wurde anschließend 5 x 5min in Waschpuffer (0,005%BSA (in TBS), 0,05%Tween20) gewaschen. Daraufhin erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper (anti-Rabbit (HSP 32) bzw. anti-Mouse (HSP 60, HSP 70 und HSC 70), 1:500 verdünnt in 3%BSA) und erneutes Waschen mit dem Waschpuffer. Anschließend wurde eine Tablette BCIP/NBT (Bromochloroindolyphosphat/Nitro blue tetrazolium) in 10ml A. dest. gelöst und auf die Membran gegeben. Nach Sichtbarwerden der Banden (1-5minütige Inkubation) wurde die Membran mit A. dest. abgespült, getrocknet und anschließend ausgewertet.

### e) Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Membrane erfolgte durch das Bioprofil Bio-1D Computerprogramm (V97.03, Vilber Lourmat, Frankreich). Dazu wurden die Membrane eingescannt und mittels der Software die Bandendichte bestimmt. Um die Blots miteinander vergleichen zu können, wurde die durchschnittliche Bandendichte der Kontrollen gleich 100% und die Werte der anderen Gruppen dazu in Bezug gesetzt. Die Durchführung der statistischen Kalkulationen erfolgte mit Hilfe des SigmaStat Programms für Windows (Version 1,0 (Jandel Cooperation, San Rafael, CA, USA)), die Berechnung der Signifikanz unter Verwendung des t-tests. Dabei befanden sich die Signifikanzgrenzen für einfach signifikante Ergebnisse bei  $p < 0,05$  und für hochsignifikante Resultate bei  $p < 0,01$ .

### 3.4 PCR

#### 3.4.1 Grundlagen

Das 1984 von dem Nobelpreisträger K. Mullis entwickelte Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR) hat die Molekulargenetik revolutioniert. Sie basiert auf einer selektiven Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen und bietet somit die Möglichkeit, auch kleinste DNA-Mengen und seltene Gene untersuchen zu können (Newton und Graham 1994). Hierzu werden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen in Einzelstränge gespalten und die gesuchte DNA mittels einer kurzen Startsequenz aus Oligonukleotiden eingerahmt. Diese so genannten Primer werden dann von der DNA-Polymerase zu einem komplementären DNA-Strang vervollständigt. Erneutes Erhitzen trennt den Doppelstrang wieder in den ursprünglichen und den neu entstandenen Strang auf. Diese stehen dann für weitere Runden der Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese zur Verfügung. So entstehen als Endergebnis einer PCR maximal  $2^n$  ( $n$  = Anzahl der Zyklen) doppelsträngige DNA-Moleküle, die Kopien der gewünschten DNA-Sequenz darstellen.

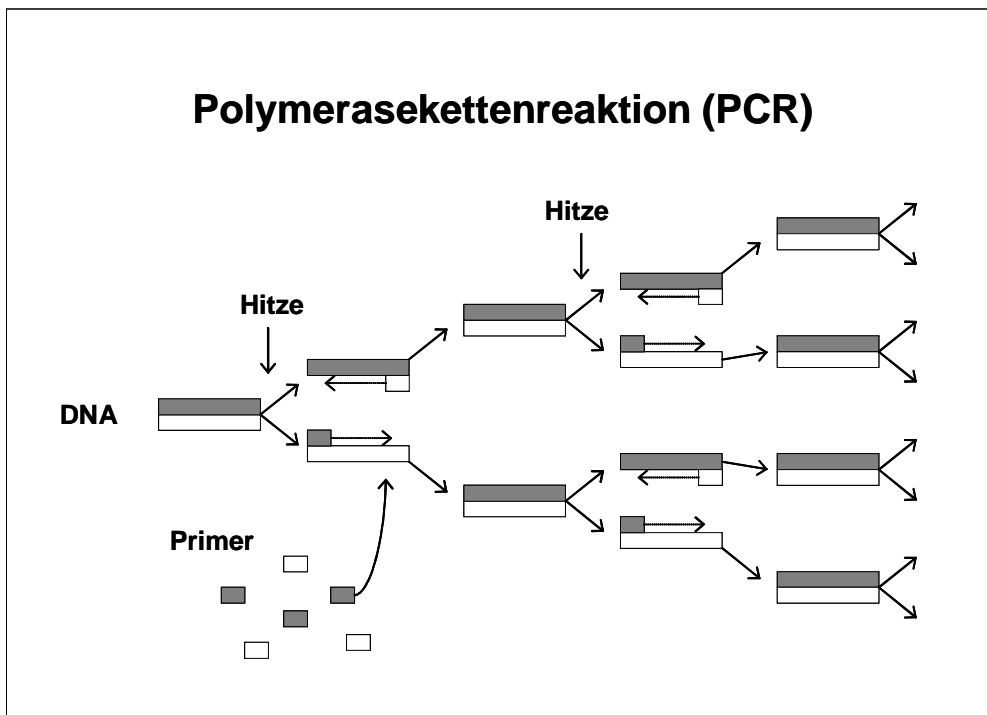


Abbildung 3-3

### 3.4.2 Kompetitive PCR

Um in einer PCR die gleiche Menge Gesamt-DNA je Ansatz einsetzen zu können, muss zunächst die DNA-Konzentration jeder Probe bestimmt werden. Dieses geschieht durch Bestimmung einer sog. Abgleich-DNA in der kompetitiven PCR. Die Abgleich-DNA darf nicht durch äußere Faktoren (wie z.B. Ozon) beeinflussbar sein und wird daher bei allen Proben gleich stark exprimiert. In der vorliegenden Arbeit fand hierfür Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Verwendung, da für dieses Gen bisher keine transkriptionelle Steuerung nachgewiesen wurde. Zusätzlich wird dem PCR-Ansatz eine DNA mit bekannter Konzentration (Kompetitor bzw. interner Standard) in einer absteigenden Konzentrationsreihe (1:1, 1:2, 1:4 und 1:8) hinzugefügt. Da sowohl die Abgleich-DNA als auch der Kompetitor mit demselben Primerpaar amplifiziert werden, entsteht eine Konkurrenz. Nach Auftrennung der DNA im Polyacrylamidgel sind deshalb bei absteigenden Intensitäten der Kompetitor-Banden (durch Einsatz der verschiedenen Konzentrationen) aufsteigende Intensitäten der Abgleich-DNA-Banden (GAPDH) zu beobachten (s. Abb.3-4). Mittels eines Computerprogramms (BIOS-Software) kann hieraus der DNA-Gehalt jeder Probe bestimmt werden, um anschließend alle Proben auf dieselbe Konzentration (in diesem Fall abgeglichen auf GAPDH) verdünnen zu können.

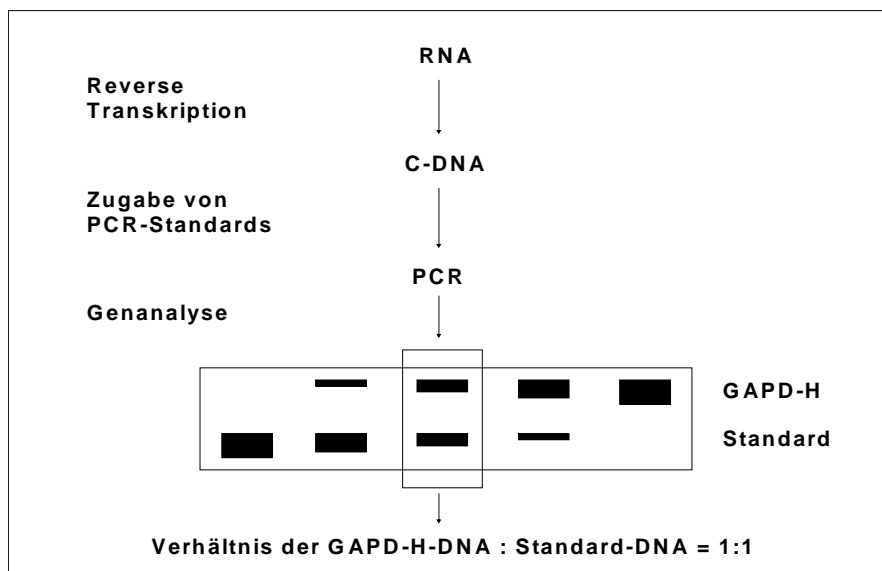


Abbildung 3-4: Prinzip der kompetitiven PCR, mod. nach Newton et al. (Newton and Graham 1994)

### 3.4.3 Durchführung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Ozon und/oder Ambroxol auf die HSP-Expression untersucht. Hierzu wurden die Proben (aus RNA umgeschriebene c-DNA (s. Kap.3.2.3) zunächst mittels der kompetitiven PCR auf GAPDH abgeglichen, in der PCR amplifiziert und die verschiedenen Expositionsgruppen miteinander verglichen.

#### a) Kompetitive PCR

Folgende Substanzen wurden auf Eis zusammenpipettiert:

Zusammensetzung einer kompetitiven PCR:

---

A. dest	37µl
c-DNA (Probe)	2µl
GAPDH-Primer 3'	1µl
GAPDH-Primer 5'	1µl
Kompetitor (je nach Ansatz 1:1, 1:2, 1:4 oder 1:8 verdünnt)	2µl
Nukleotid-Mix	1µl
PCR-Puffer	5µl
dTaq-Polymerase	1µl

---

Die kompetitive PCR erfolgte daraufhin mit folgenden Konfigurationen:

- Heißstart, 1min 62°C, 1min 72°C, 1min 94°C, 22 Zyklen

Im Anschluss wurde die c-DNA in einem Polyacrylamidgel 45min bei 120mA aufgetrennt, das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend eingescannt. Mittels der BIOS Computersoftware wurden die Bandenintensitäten in Zahlenwerte umgeschrieben und diese in eine lineare Regression eingesetzt. Die variable Komponente war dabei die Konzentration der c-DNA, die in Verhältnis zur nicht-variablen Konzentration des Kompetitors gesetzt wurde. Die Schnittstelle der Geraden mit der x-Achse (0-Ebene) ergab dann den Prozentrang, welcher der c-DNA-

Konzentration entsprach. Auf diesem Wege wurde für jede c-DNA-Probe die Konzentration bestimmt und durch Verdünnung alle Proben auf den gleichen Prozentrang eingestellt.

b) Kontroll-PCR/HSP-PCR

Um zu kontrollieren, ob tatsächlich jede Probe die gleiche Menge an mit GAPDH abgeglichenen c-DNA enthält, wurde eine GAPDH-PCR durchgeführt. Eventuelle Unterschiede der Bandendicke wurden durch Verdünnung der Proben so lange korrigiert, bis alle Banden die gleiche Intensität aufwiesen. Anschließend erfolgte die Durchführung der eigentlichen HSP-PCR. Dazu wurden folgende Substanzen auf Eis zusammengegeben:

Zusammensetzung einer GAPDH- bzw. HSP-PCR:

A. dest	28µl
abgeglichene c-DNA-Probe	2µl
3'Primer (je nach PCR HSP 32, HSP 60, HSP 70, HSC 70 oder GAPDH)	1µl
5'Primer (je nach PCR HSP 32, HSP 60, HSP 70, HSC 70 oder GAPDH)	1µl
Nukleotid-Mix (bei HSP 70 1:3 verdünnt, sonst 1:1)	1µl
PCR-Puffer	5µl
Taq-Polymerase	0,25µl

Die PCRs wurden anschließend unter folgenden Konditionen durchgeführt:

- HSP 32, -60 u. GAPDH: Heißstart, 1min 62°C, 1min 72°C, 1min 94°C, 22 Zyklen
- HSP 70: Heißstart, 1min 53°C, 1min 72°C, 1min 94°C, 28 Zyklen
- HSC 70: Heißstart, 1min 57°C, 1min 72°C, 1min 94°C, 28 Zyklen

Die PCR-Produkte wurden in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dazu wurden je Gelansatz neben 4 Kontrollproben zwei Gruppen mit je 5 Proben untersucht. Dabei wurde ein Gel mit den Proben von 1)alleiniger Ozonexposition und 2)Ozon mit Ambroxol sowie ein zweites Gel mit 1)Ozon mit Ambroxol und 2)alleinige Ambroxolbehandlung beladen. Anschließend wurden die Bandenintensitäten mit Hilfe der BIOS Software densitometrisch bestimmt und die Ergebnisse der verschiedenen Expositionsgruppen in Bezug zu denen der Kontrollproben (100%) gesetzt (siehe auch Auswertung vom Western-Blot (Kap. 3.3.2)).

#### 4 Ergebnisse

In Kap.4.1 kommen die Auswirkungen verschiedener Ozonkonzentrationen und -zeiten auf die HSP Expression zur Darstellung. Das nachfolgende Kap. 4.2 beschreibt die Auswirkungen von alleiniger Ambroxolgabe (ohne Ozonexposition) auf die HSP-Expression. Anschließend wird in Kap. 4.3 der Effekt des Ambroxols auf die Ozon-induzierte HSP-Expression aufgezeigt. Die Abbildung 4-1 zeigt eine vereinfachte Übersicht der Ergebnisse. Die detaillierten Übersichtstabellen mit allen Mittelwerten, Standardabweichungen und Signifikanzen sowie die Original Blots befinden sich im Anhang.

	8h 1,5ppm	8h1,5ppm +A	8h 3ppm	8h 3ppm+A	8h A	12h 0,6ppm	12h 0,6ppm+A	12h A	24h 0,6ppm	24h 0,6ppm+A	24hA
<b>HSP 32</b>											
Western Blot:	↑	↑	↑	↑	↔	↑	↑	↑	↑	↑	↑
PCR:	↑	↑	↑	↑	↔	↑	↑	↔	↔	↔	↔
<b>HSP 70</b>											
Western Blot:	↓	↓	↓	↓	↔	↓	↓	↓	↔	↓	↔
PCR:	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↔	↔	↔
<b>HSC 70</b>											
Western Blot:	↓	↓	↓	↓	↔	↓	↓	↔	↔	↔	↔
PCR:	↑	↑	↔	↑	↔	↔	↓	↔	↓	↓	↓
<b>HSP 60</b>											
Western Blot:	↓	↓	↓	↔	↔	↓	↓	↔	↓	↓	↓
PCR:	↓	↔	↔	↔	↑	↓	↔	↓	↓	↓	↔

Abbildung 4-1

#### 4.1 HSP nach Ozonexposition

In diesem Kapitel werden die Auswirkungen der verschiedenen Ozonkonzentrationen und Expositionszeiten auf die HSP-Expression beschrieben. Hierbei sind die Signifikanzen im Vergleich zu den Kontrollen (nichtexponierte Tiere) mit  $p_K$  gekennzeichnet und in den Grafiken mit \* (signifikant:  $0,05 > p_K > 0,01$ ) sowie mit \*\* (hochsignifikant:  $p_K < 0,01$ ) dargestellt.

##### 4.1.1 HSP 32

###### a) Western Blot

Auf Proteinebene zeigte sich nach Ozonexposition eine hochsignifikant verstärkte HSP 32-Expression, die sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig war. So stieg HSP 32 im Vergleich zu den Kontrollen von 8h bis 24h kontinuierlich an (8h 3ppm: 436,5%  $p_K < 0,0001$ , 12h 0,6ppm: 683%  $p_K = 0,0003$ , 24h 0,6ppm: 989,3%  $p_K = 0,0001$ ). Des Weiteren bewirkte die höhere  $O_3$ -Konzentration von 8h 3ppm eine stärkere HSP 32-Expression als 8h 1,5ppm Ozon (8h 3ppm: 436,5% vs. 8h 1,5ppm: 360%  $p_K < 0,0001$ ) (s. Abb. 4-2).

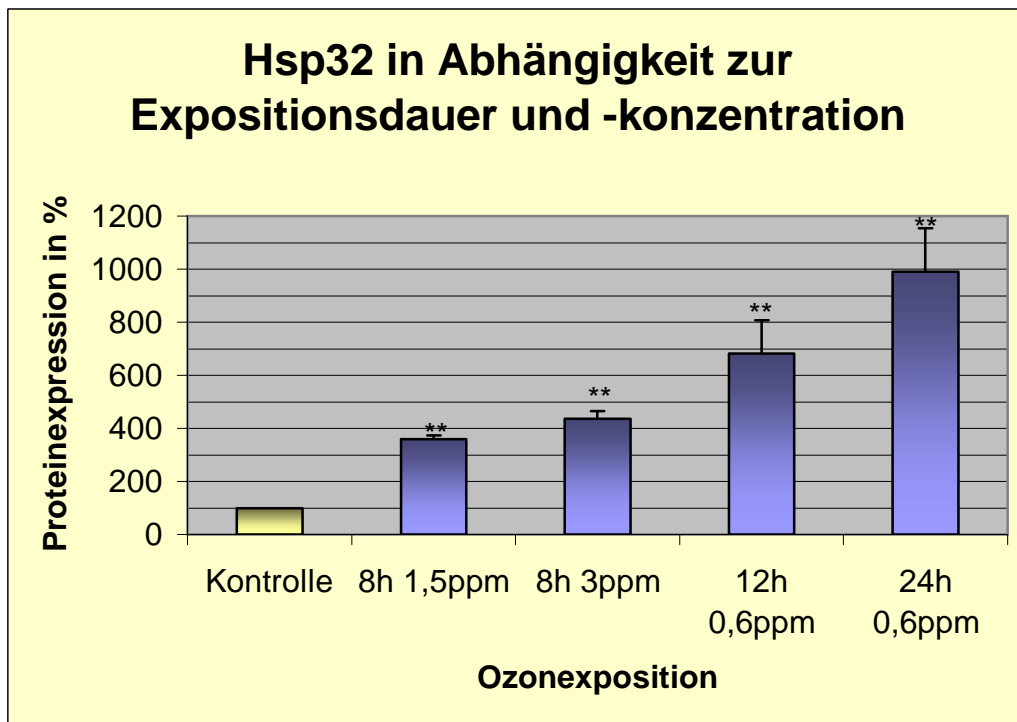


Abbildung 4-2

## b) PCR

In der PCR zeigte die HSP 32 m-RNA (umgeschrieben in c-DNA, s. Kap. 3.2.3) nach 8 und 12stündiger Ozonexposition einen hochsignifikanten Anstieg (s. Abb. 4-3). Dieser war bei kurzer Exposition am stärksten ausgeprägt (8h 1,5ppm: 626,4%  $p_K < 0,0001$ , 8h 3ppm: 536,2%  $p_K < 0,0001$ ), fiel bei steigender Expositionsdauer ab (12h 0,6ppm: 267,2%  $p_K < 0,0001$ ) und erreichte nach 24h 0,6ppm nahezu das Kontrollniveau (24h 0,6ppm: 121%).

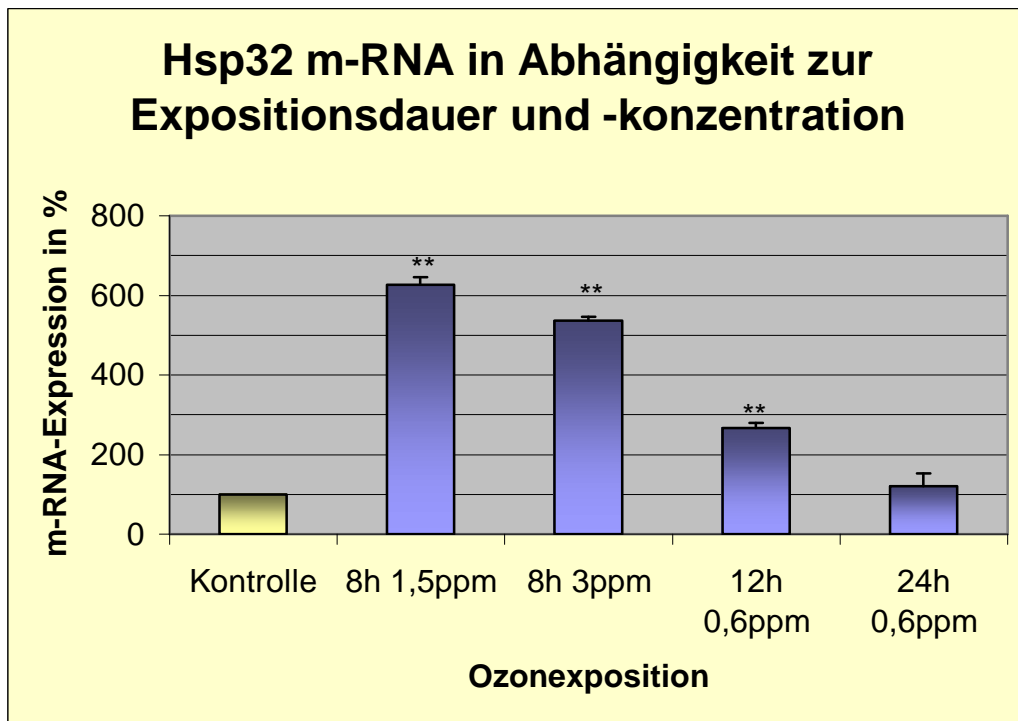


Abbildung 4-3

## 4.1.2 HSP 70

## a) Western Blot

HSP 70 zeigte bei 8- und 12stündiger Ozonexposition eine im Vergleich zu den Kontrollen hochsignifikante Verminderung der Protein-Expression (8h 1,5ppm: 40,7%  $p_K=0,0029$ , 8h 3ppm: 10,7%  $p_K<0,0001$ , 12h 0,6ppm: 53,7%,  $p_K<0,0001$ ) (s. Abb. 4-4). Dabei resultierte bei der höheren Ozonkonzentration von 8h 3ppm ein stärkerer Abfall als bei der niedrigeren (8h 3ppm: 10,7% vs. 8h 1,5ppm: 40,7%). Bei 24h 0,6ppm ergab sich gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung (83%).

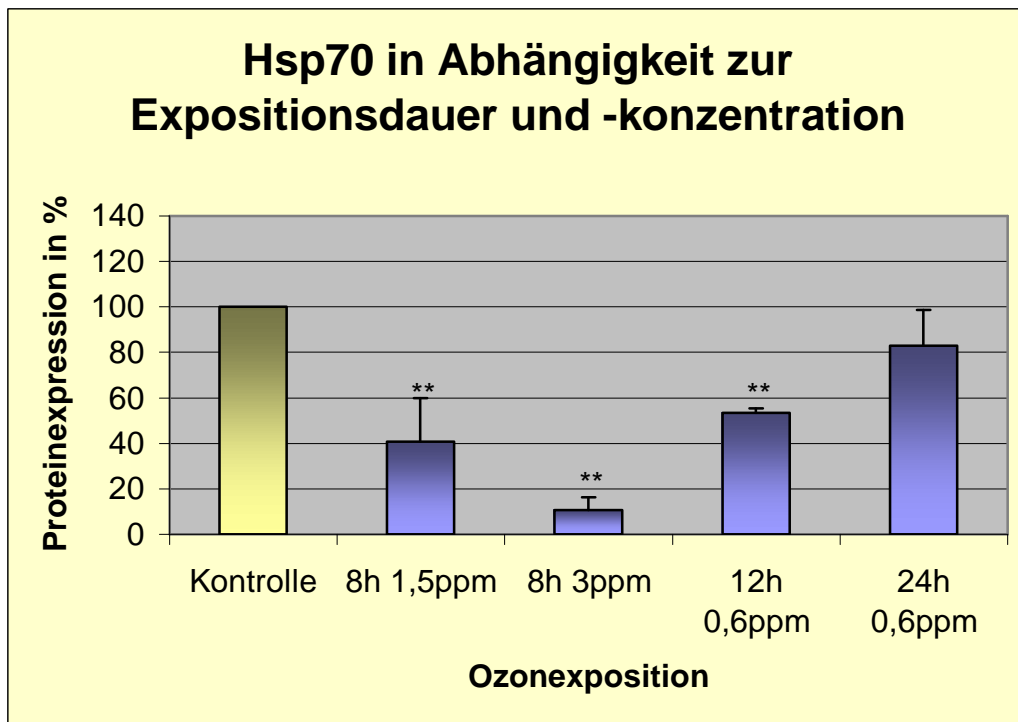


Abbildung 4-4

## b) PCR

Auf m-RNA-Ebene löste die 8- und 12stündige Ozonexposition eine hochsignifikante Zunahme der Expression aus (s. Abb. 4-5). Diese war bei 8h am stärksten ausgeprägt (8h 1,5ppm: 249,8%  $p_K=0,0084$ , 8h 3ppm: 247,8%  $p_K=0,0006$ ) und nahm bei zunehmender Expositionsdauer ab (12h 0,6ppm: 163,44%  $p_K=0,0027$ ). Bei 24stündiger Exposition befand sich die Expression nahe den Kontrollwerten (24h 0,6pp: 106,1%).

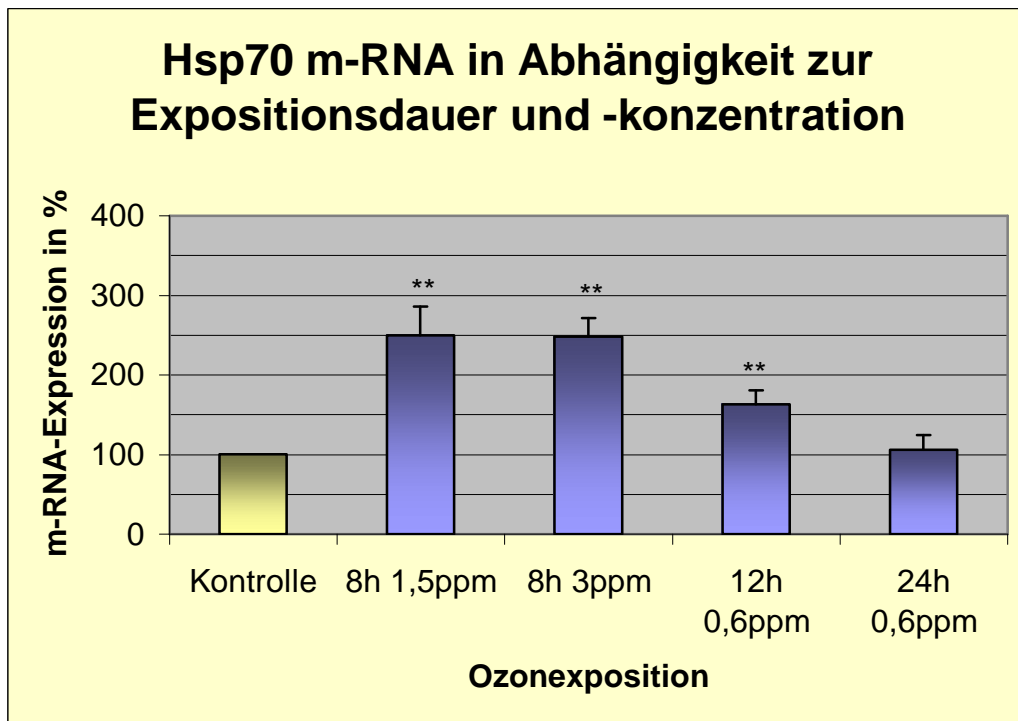


Abbildung 4-5

## 4.1.3 HSC 70

## a) Western Blot

Nach 8- und 12stündiger Ozonexposition verminderte sich die HSC 70 Proteinexpression in Relation zu den Kontrollen hochsignifikant, wobei dieser Abfall am stärksten bei 8h 3ppm ausgeprägt war (8h 3ppm: 9,3%  $p_K < 0,0001$ , 8h 1,5ppm: 61,7%  $p_K < 0,0001$ , 12h 0,6ppm: 55,3%  $p_K = 0,0034$ ) (s. Abb. 4-6). Bei 24h 0,6ppm ergab sich gegenüber den Kontrollen keine Veränderung (24h 0,6ppm: 97%).

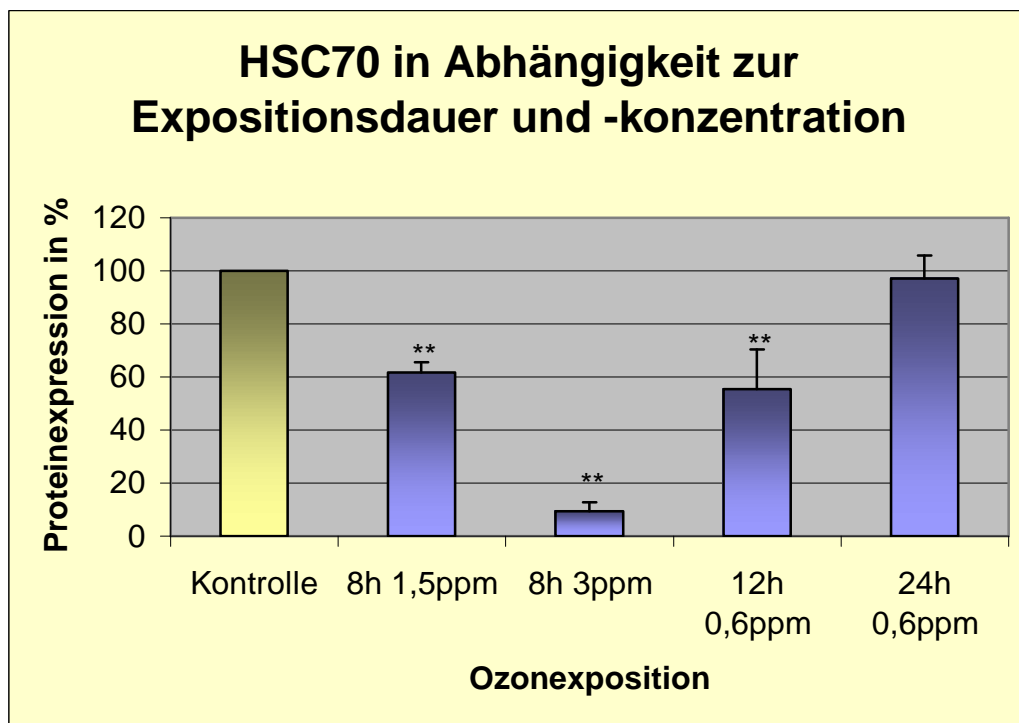


Abbildung 4-6

## b) PCR

Die HSC 70 m-RNA-Exposition nahm bei längerer Ozon-Expositionsdauer ab: Während bei 8h 1,5ppm die HSC 70-m-RNA signifikant erhöht war (135,8%,  $p_K=0,0489$ ), lag die Expression bei 8h 3ppm (110,7%) und 12h 0,6ppm (95,6%) im Kontrollniveau und fiel bei 24h 0,6ppm hochsignifikant unter dieses ab (34,7%  $p_K=0,0002$ ) (s. Abb. 4-7).

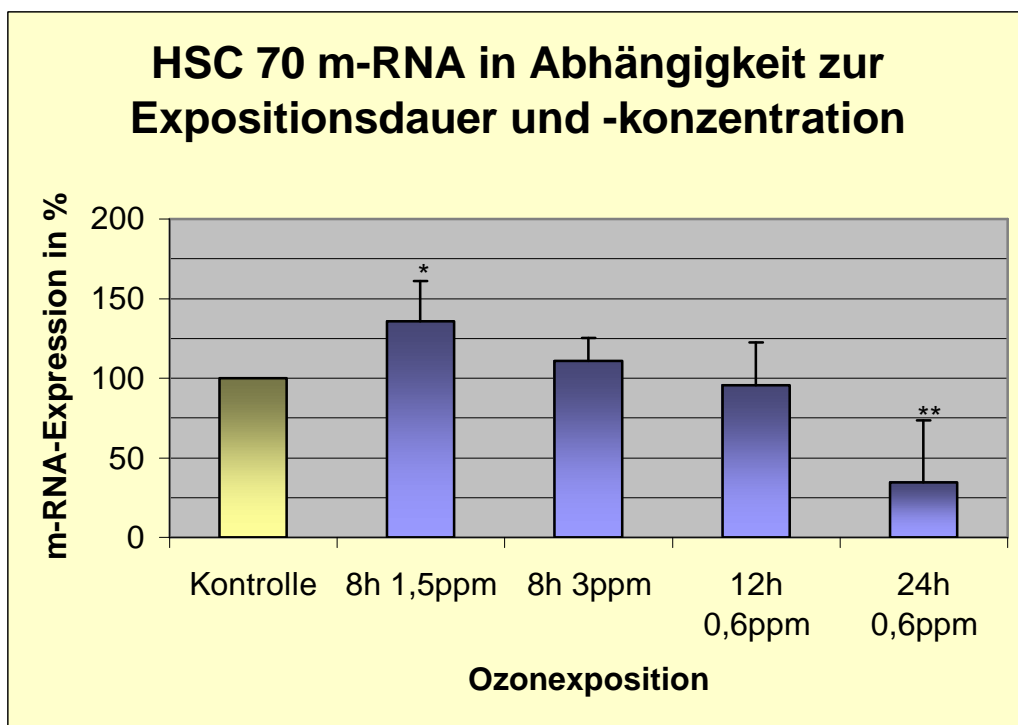


Abbildung 4-7

## 4.1.4 HSP 60

## a) Western Blot

Im Vergleich zu den Kontrollen bewirkte Ozon bei allen Expositionszeiten und Konzentrationen eine hochsignifikante Verminderung des HSP 60 Proteins (8h 1,5ppm: 66,3%  $p_K=0,0094$ , 12h 0,6ppm: 76,3%  $p_K=0,0003$ , 24h 0,6ppm: 77%  $p_K=0,0038$ ) (s. Abb. 4-8). Dabei war diese am stärksten bei 8h 3ppm ausgeprägt (8h 3ppm: 40,2%  $p_K=0,0012$ ).

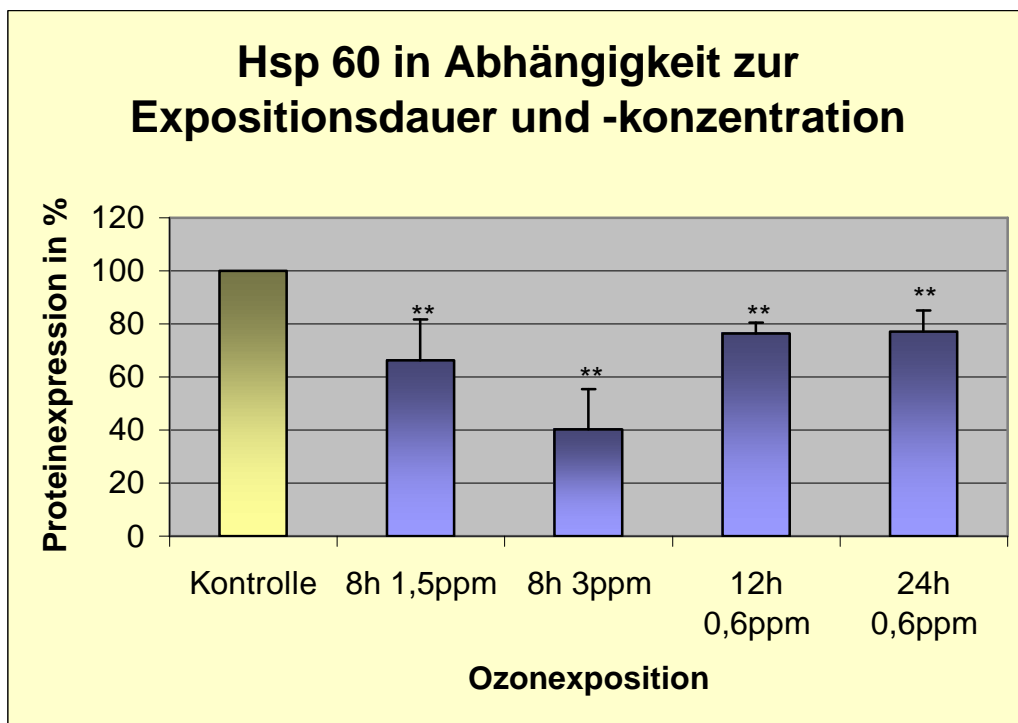


Abbildung 4-8

## b) PCR

Die Ozonexposition mit 8h 1,5ppm, 12h 0,6ppm und 24h 0,6ppm löste einen signifikanten bis hochsignifikanten Abfall der HSP 60 m-RNA aus (8h 1,5ppm: 79,3%  $p_K=0,0028$ , 12h 0,6ppm: 88,9%  $p_K=0,0220$ , 24h 0,6ppm: 56,3%  $p_K=0,0061$ ) (s. Abb. 4-9). 8h 3ppm O<sub>3</sub> bewirkte hingegen keine signifikante Veränderung gegenüber den Kontrollen (108,1%).

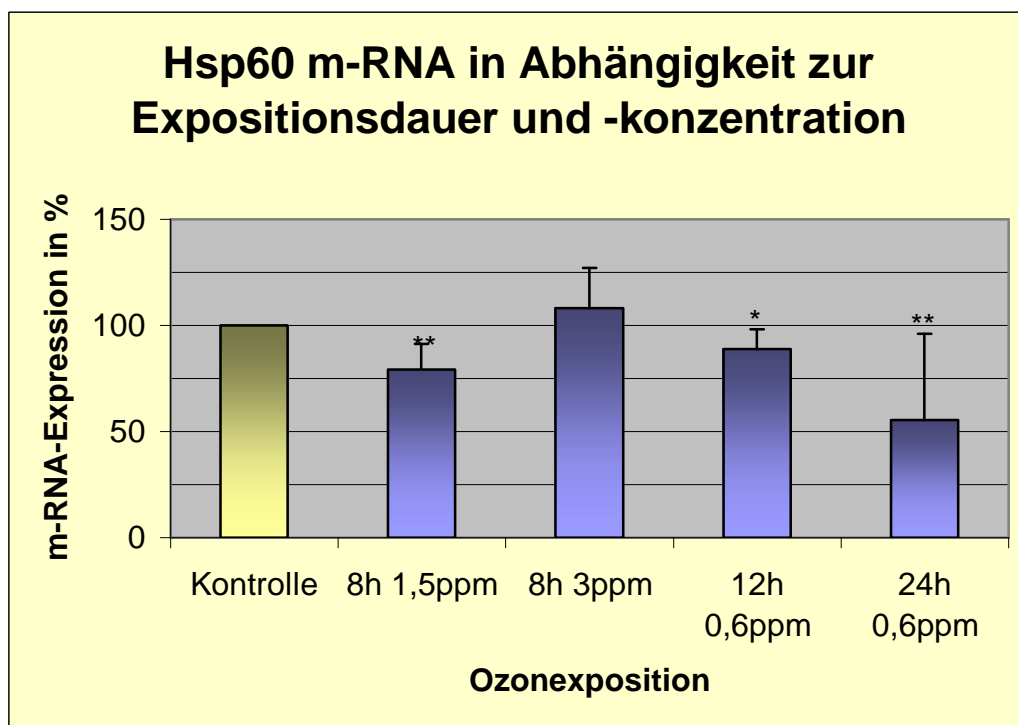


Abbildung 4-9

## 4.2 Auswirkung alleiniger Ambroxol-Applikation

### 4.2.1 HSP 32

Die alleinige Gabe von Ambroxol hatte nur bei der 12hA und 24hA Gruppe eine signifikante Auswirkung auf die HSP 32 Protein-Expression (gemessen im Western Blot): Während HSP 32 nach 8h Ambroxol im Vergleich zu den Kontrollen keinen signifikanten Unterschied zeigte (8h A: 131,7%), ergab sich nach 12h und 24h Ambroxol ein hochsignifikanter Anstieg (208,5%  $p_K=0,0054$  und 155,5%  $p_K=0,0021$ ) (s. Abb.4-10). Bei der in der PCR untersuchten m-RNA bewirkte Ambroxol in keiner der Gruppen eine signifikante Veränderung (8h A: 145,1%, 12h A: 88,9%, 24h A: 118,8%) (s. Abb.4-10).

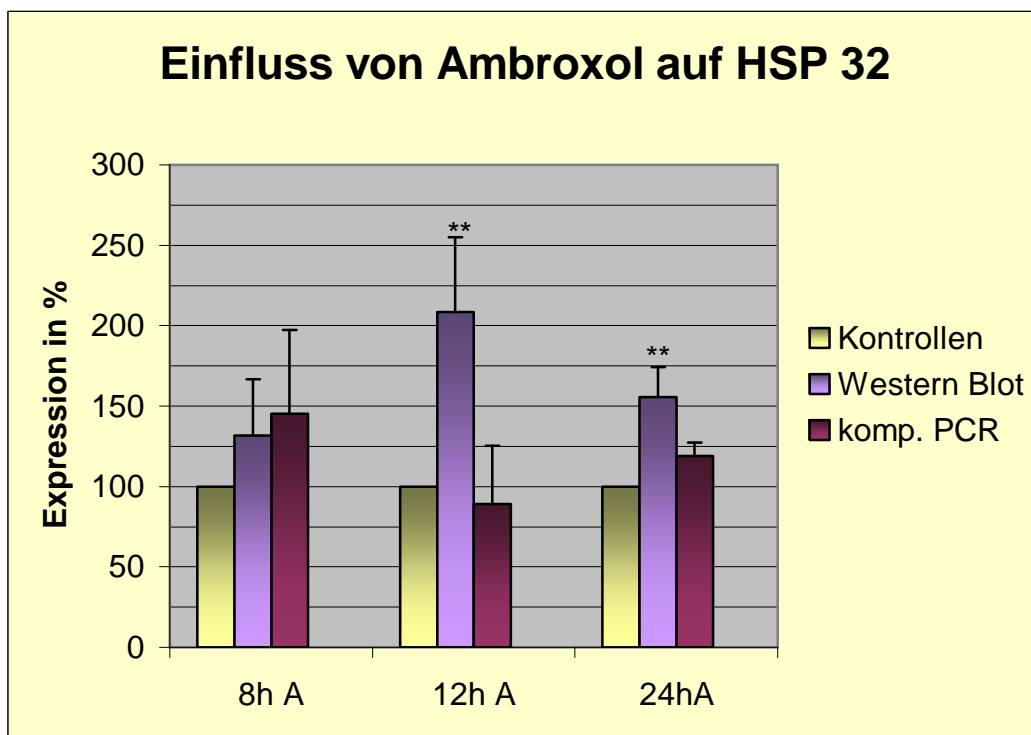


Abbildung 4-10

## 4.2.2 HSP 70

Das HSP 70 Protein zeigte nach Ambroxol-Applikation nur in der 12h A Gruppe eine signifikante Verminderung (77,3%  $p_K=0,0119$ ). Bei den anderen Gruppen wurde die Expression durch Ambroxol nicht beeinflusst (8hA: 82,3%, 24hA: 85%) (s. Abb.4-11). Während Ambroxol bei der 24h A Gruppe keine signifikante Veränderung der HSP 70 m-RNA bewirkte (124,9%), war die Expression in der PCR bei 8hA und 12hA gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt (8hA: 65,9%  $p_K=0,0017$ , 12hA: 66,1%  $p_K=0,0188$ ) (s. Abb.4-11).

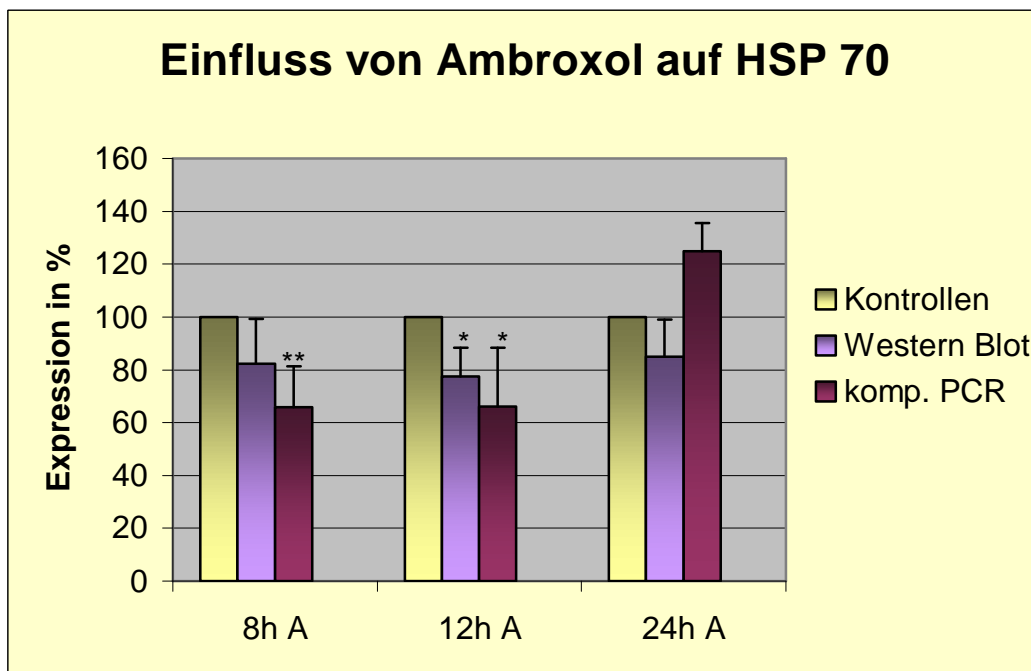


Abbildung 4-11

## 4.2.3 HSC 70

Ambroxol übte bei keiner der Gruppen einen deutlichen Einfluss auf das HSC 70 Protein (Western Blot) aus (8hA: 100%, 12hA: 95%, 24hA: 96,7%). Bis auf eine Ausnahme – einer signifikanten Verminderung bei 24hA auf 67,5% ( $p_K=0,0303$ ) – ließ sich auch bei der m-RNA-Expression (gemessen in der PCR) keine Veränderung durch Ambroxol feststellen (8hA: 84,2%, 12hA: 103,9%) (s. Abb.4-12).

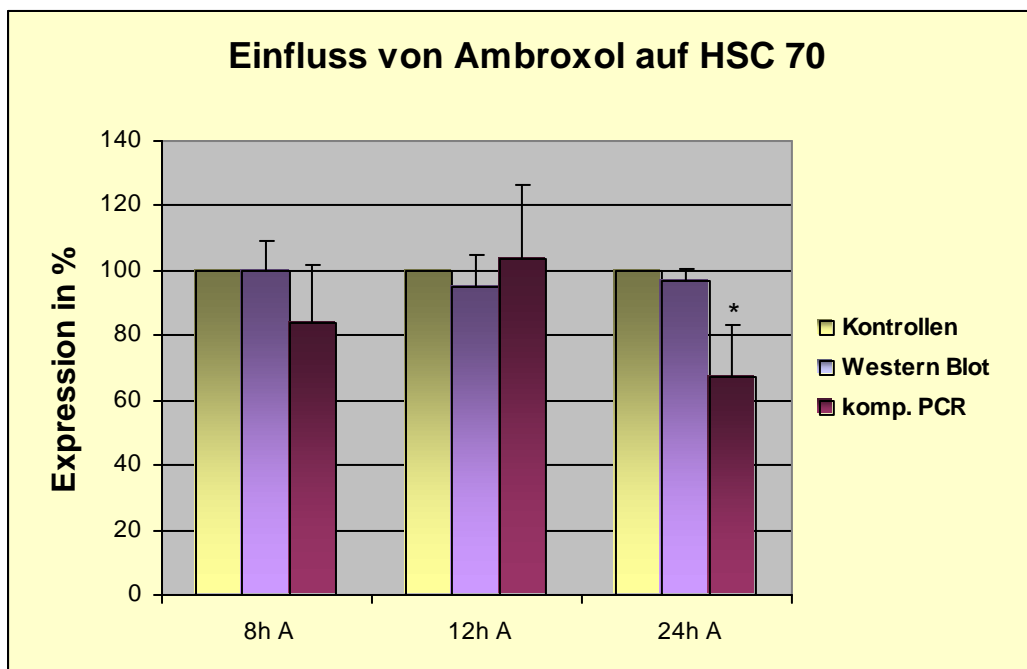


Abbildung 4-12

## 4.2.4 HSP 60

Auf Protein-Ebene fand nur bei der 24h A Gruppe eine durch Ambroxol bedingte Veränderung der Expression statt (69,2%  $p_K < 0,0001$ ). Bei den anderen Gruppen blieb sie im Vergleich zu den Kontrollen unverändert (8hA: 92,6%, 12hA: 89,1%). Die HSP 60 m-RNA zeigte bei den einzelnen Gruppen unterschiedliche Ergebnisse: Während sich in bei 8hA ein signifikanter Anstieg zeigte (137,2%  $p_K = 0,0266$ ) war die Expression bei 12hA hochsignifikant vermindert (75,9%  $p_K = 0,0015$ ) (s. Abb.4-13).

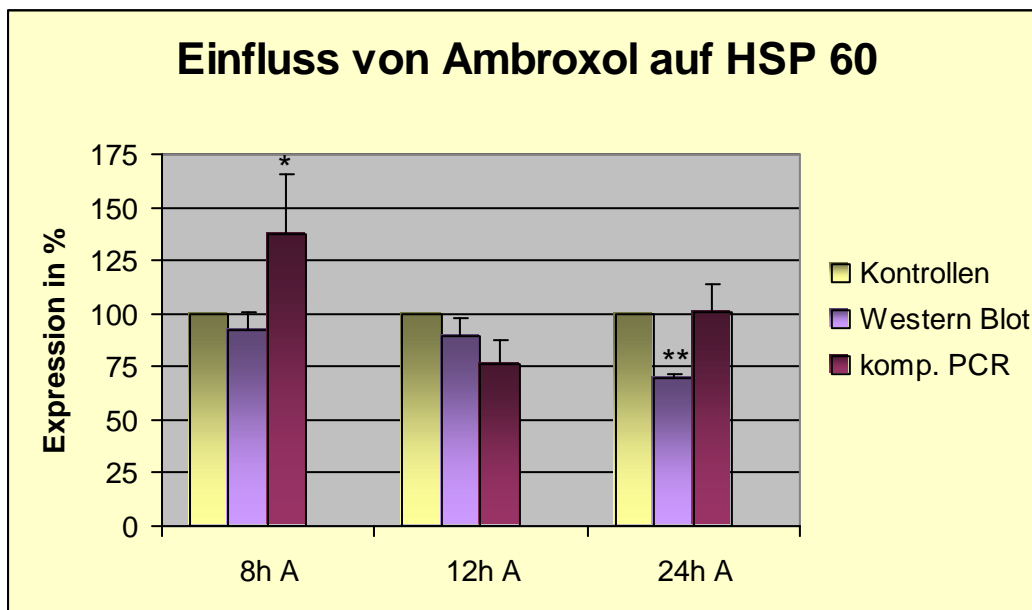


Abbildung 4-13

### 4.3 HSP nach Ozonexposition und Ambroxol

In Kap. 4.3 wird der Effekt des Ambroxols auf die Ozon-induzierte HSP-Expression aufgezeigt. Die dazu berechneten Signifikanzen von alleiniger Ozonexposition im Vergleich zu Ozon + Ambroxol werden  $p_A$  benannt und in den Grafiken mittels + (signifikant:  $0,05 > p_A > 0,01$ ) sowie mit ++ (hochsignifikant:  $p_A < 0,01$ ) markiert.

#### 4.3.1 HSP 32

##### a) Western Blot

Im Vergleich zur alleinigen Ozonexposition trat bei der Gruppe 8h 3ppm+Ambroxol eine signifikante Hemmung des Ozon-bedingten HSP 32-Anstieges auf (Signifikanz von 8h 3ppm zu 8h 3ppm+A:  $p_A < 0,0001$ , in Abb. 4-14 mit ++ markiert): So verminderte sich der Ozon-bedingte HSP 32-Proteinanstieg bei 8h 3ppm von 436,5% (s.o.) auf 119,8% (8h 3ppm+A  $p_K = 0,0226$ ). Bei den anderen Gruppen wies Ambroxol keinen eindeutigen modulierenden Effekt auf. Die Protein-Expression blieb trotz Ambroxolgabe signifikant (8h 1,5ppm+A: 339,5%  $p_K = 0,0233$ ) bis hochsignifikant (12h 0,6ppm+A: 545,25%  $p_K = 0,0024$ , 24h 0,6ppm+A: 830,5%  $p_K = 0,0003$ ) über dem Kontrollniveau (s. Abb.4-14).

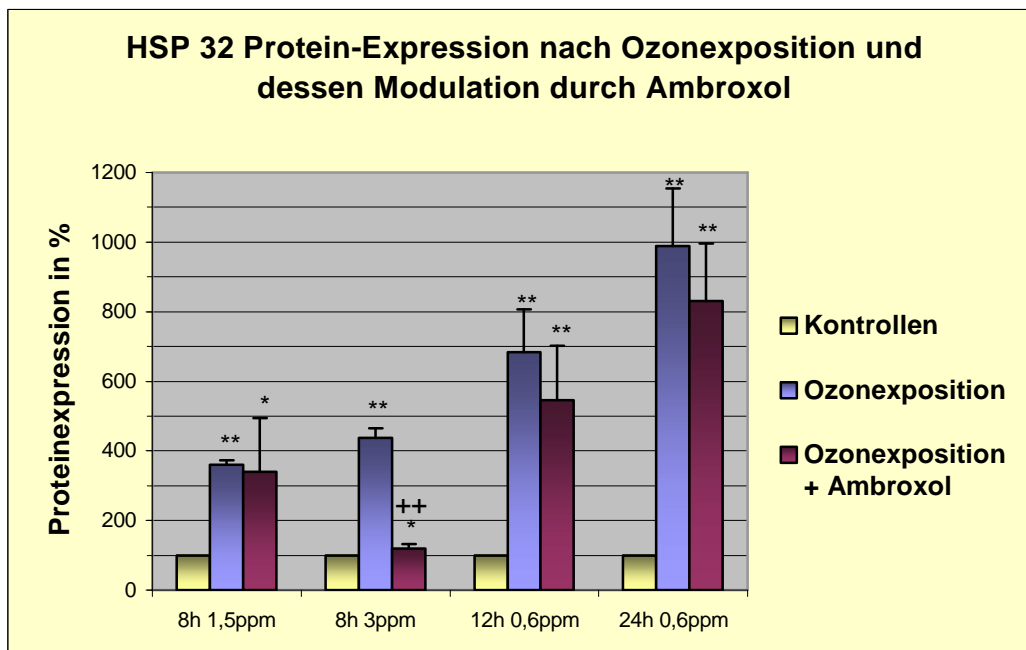


Abbildung 4-14

## b) PCR

Auch mit zusätzlicher Ambroxolgabe befanden sich die Gruppen 8h 1,5ppm+A und 8h 3ppm+A hochsignifikant über dem Kontrollniveau (445,9%  $p_K < 0,0001$  und 672,2%  $p_K < 0,0001$ ). Ambroxol bewirkte bei 8h 1,5ppm+A im Vergleich zur alleinigen Ozonexposition eine signifikante Verminderung (von 626,4% auf 445,9%,  $p_A = 0,0291$ ), bei 8h 3ppm+A allerdings eine signifikante Erhöhung (von 536,2% auf 672,2%,  $p_A = 0,0194$ ) der HSP 32 m-RNA. Bei 12h 0,6ppm+A und 24h 0,6ppm+A ergaben sich unter Einfluss von Ambroxol keine signifikanten Veränderungen (von 267,2 auf 236,1% (12h), und von 121,2% auf 93,5% (24h)) (s. Abb. 4-15).

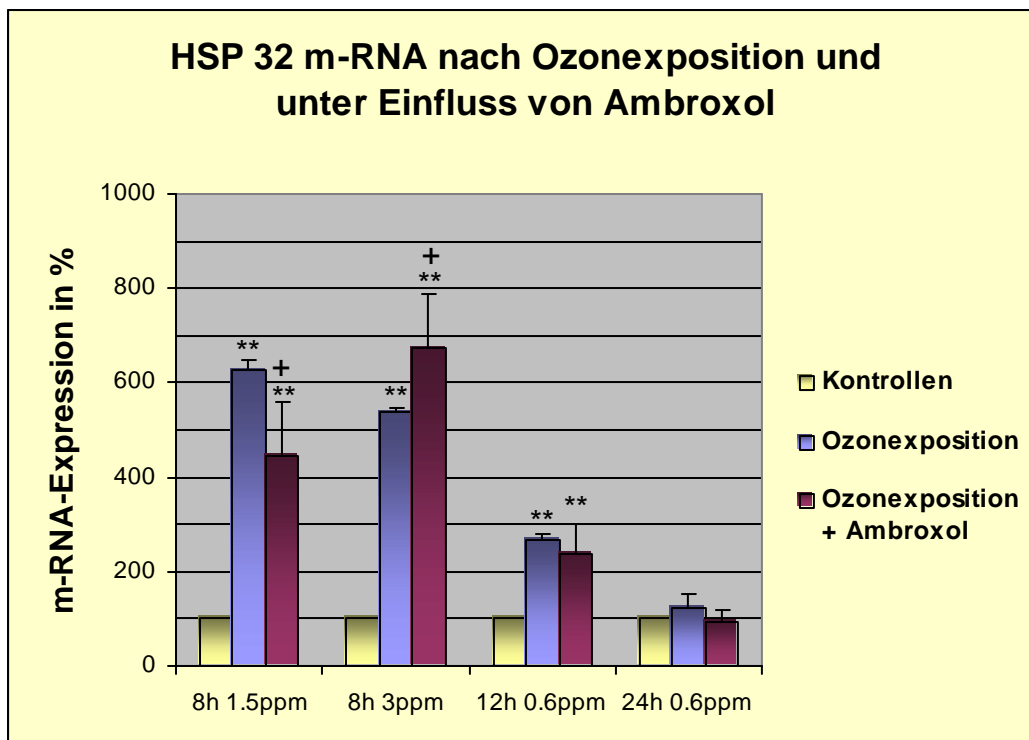


Abbildung 4-15

## 4.3.2 HSP 70

## a) Western Blot

Bei 8h 3ppm+A und 12h 0,6ppm+A erhöhte die zusätzliche Ambroxolgabe (im Vergleich zur alleinigen O<sub>3</sub>-Exposition) das HSP 70 Protein (8h 3ppm+A: 10,7% auf 46,5%  $p_K=0,0006$   $p_A=0,0037$  und 12h 0,6ppm: von 53,3% auf 69%  $p_K=0,0036$   $p_A=0,0348$ ). Dennoch befand sich die Expression noch hochsignifikant unterhalb des Kontrollniveaus. Bei den anderen Gruppen bewirkte Ambroxol keine signifikante Veränderung (8h 1,5ppm+A: 57,7%  $p_K=0,0085$ , 24h 0,6ppm+A 79,7%  $p_K=0,0304$ ) (s. Abb. 4-16).

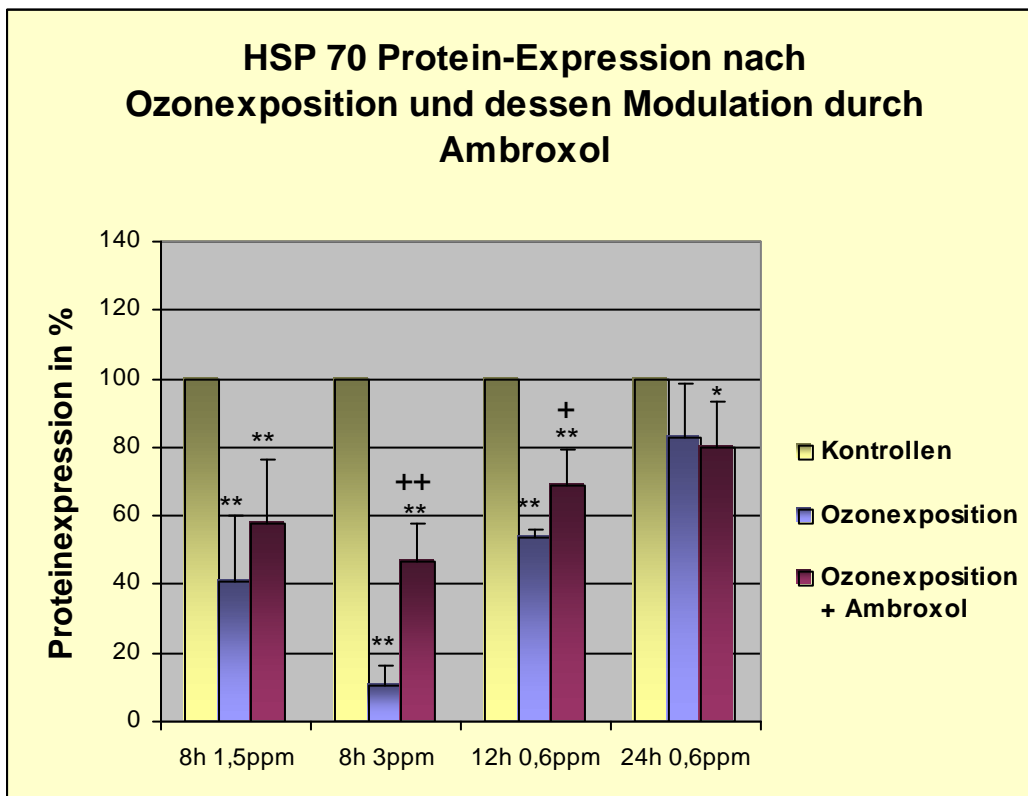


Abbildung 4-16

## b) PCR

Ambroxol bewirkte nur bei 8h 3ppm+A eine deutliche Modifikation der HSP 70 m-RNA. Im Vergleich zur alleinigen Ozonexposition verstärkte es dessen Expression hochsignifikant von 247,8% (8h 3ppm, s.o.) auf 360% (8h 3ppm+A,  $p_K < 0,0001$   $p_A = 0,0014$ ). Bei allen anderen Gruppen übte Ambroxol keine signifikante Modulation aus (8h 1,5ppm+A: 241,1%  $p_K = 0,0163$ , 12h 0,6ppm+A: 197,6%  $p_K = 0,0020$ , 24h 0,6ppm+A: 116,8%) (s. Abb. 4-17).

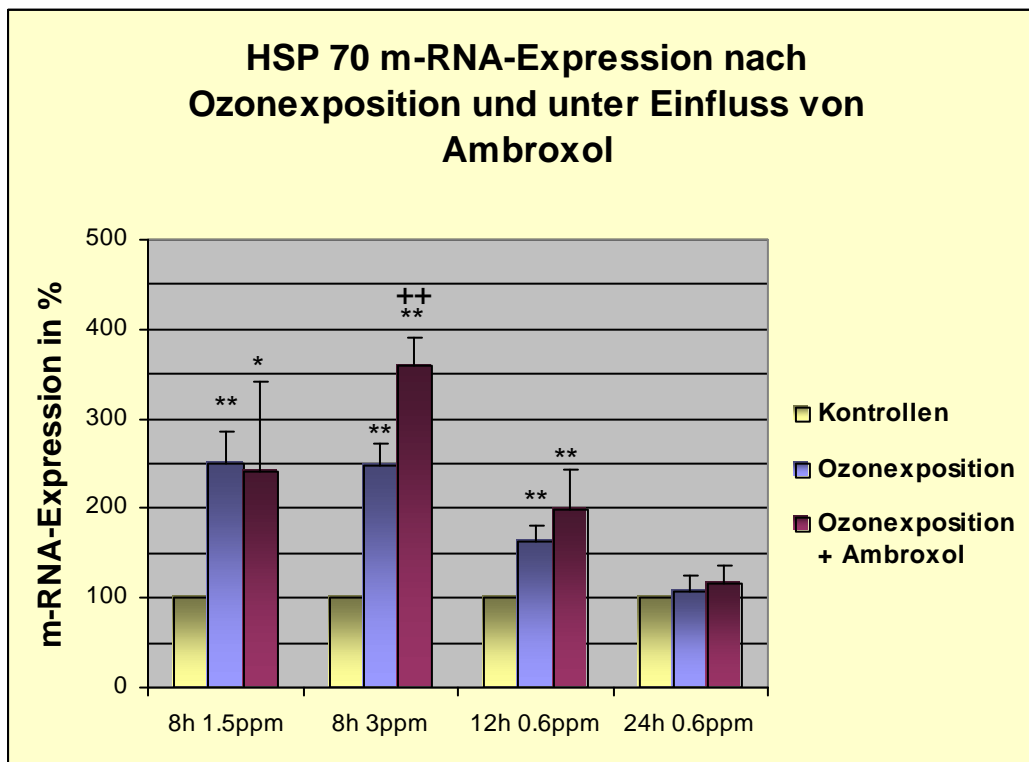


Abbildung 4-17

## 4.3.3 HSC 70

## a) Western Blot

Eine signifikante Änderung der HSC 70 Protein-Expression durch Ambroxol war nur bei 8h 3ppm zu beobachten. Diese geschah in Form einer hochsignifikanten Hemmung des O<sub>3</sub>-induzierten HSC 70 Abfalls. Während die HSC 70-Expression nach 8h 3ppm bis auf 9,3% abfiel (s.o.), verminderte sie sich bei zusätzlicher Ambroxolgabe nur auf 61,3% ( $p_K=0,0005$ ,  $p_A=0,0002$ ) (s. Abb.4-18). Bei den anderen Gruppen war kein signifikanter Ambroxol-Effekt festzustellen. Die Expressionen nach 8h 1,5ppm+A und 12h 0,6ppm+A blieben im Vergleich zu den Kontrollen signifikant bzw. hochsignifikant erniedrigt (8h 1,5ppm+A: 63,4%  $p_K=0,0174$ , 12h 0,6ppm+A: 60%  $p_K=0,0011$ ). Die HSC 70 Protein-Expression der 24h 0,6ppm+A Gruppe befand sich auch mit Ambroxol im Bereich der Kontrollen (24h 0,6ppm+A: 95%).

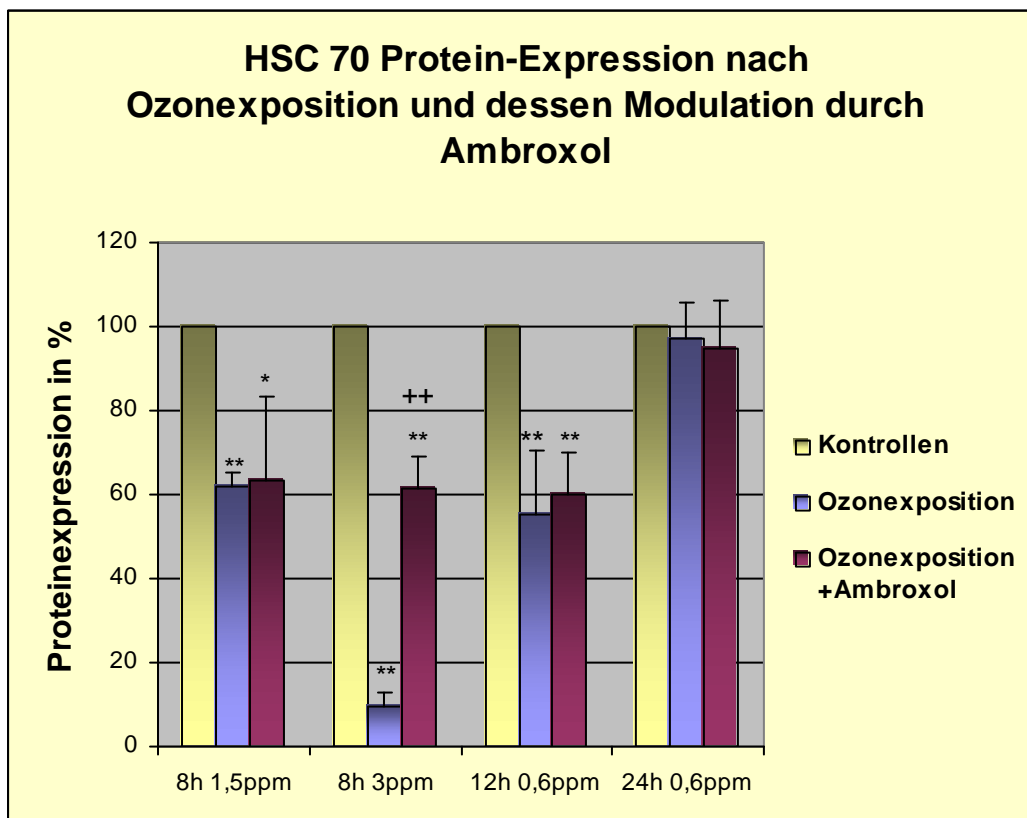


Abbildung 4-18

b) PCR

Eine Modulation der Expression bei zusätzlich verabreichtem Ambroxol fand nur bei 8h 3ppm+A statt. Hier erhöhte Ambroxol die HSC 70 m-RNA signifikant von 110,7% auf 128,4% ( $p_K=0,0013$ ,  $p_A=0,0280$ ). Bei allen anderen Gruppen wurde keine Expressionsveränderung gegenüber Ozon allein bewirkt (8h 1,5ppm+A: 135,9%  $p_K=0,0422$ , 12h 0,6ppm+A: 72,7%  $p_K=0,0432$ , 24h 0,6ppm+A: 26,1%  $p<0,0001$ ) (s. Abb. 4-19).

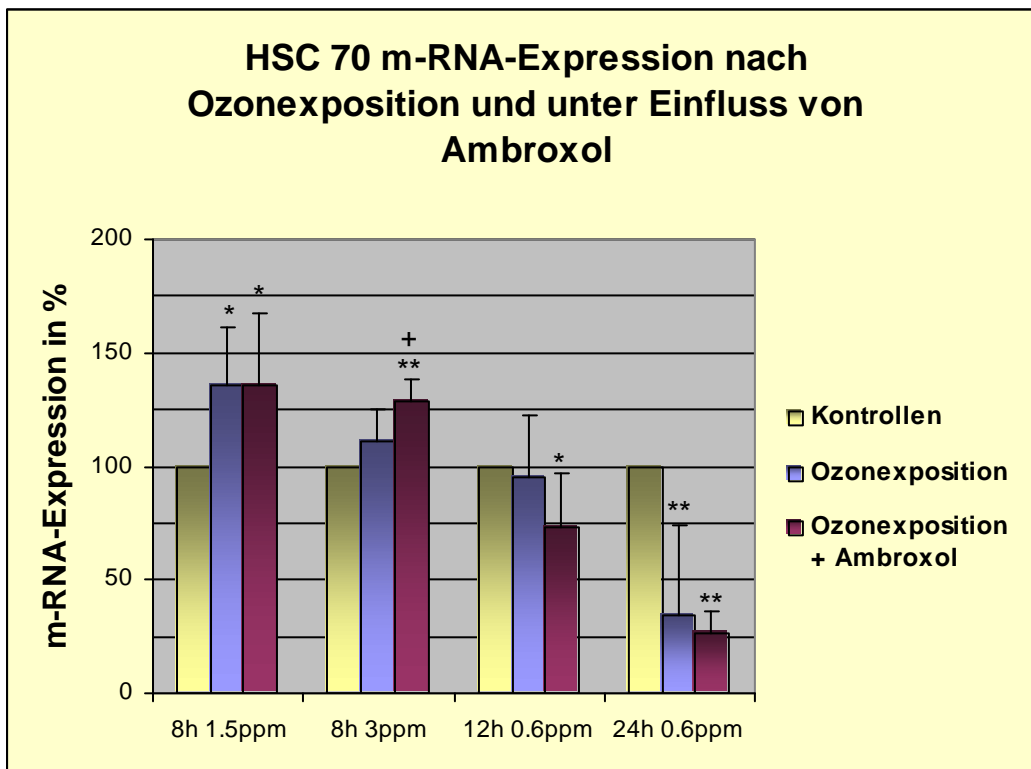


Abbildung 4-19

## 4.3.4 HSP 60

## a) Western Blot

Zusätzlich verabreichtes Ambroxol übte bei keiner Gruppe einen modulierenden Effekt auf die Ozon-induzierte HSP 60 Protein-Expression aus. Demnach traten bei 8h 1,5ppm+A (39,3%  $p_K=0,0058$ ), 8h 3ppm+A (75,9%), 12h 0,6ppm+A (68,5%  $p_K=0,0048$ ) sowie 24h 0,6ppm+A (72,2%  $p_K=0,0098$ ) keine signifikanten Unterschiede gegenüber alleiniger  $O_3$ -Exposition auf (s. Abb.4-20).

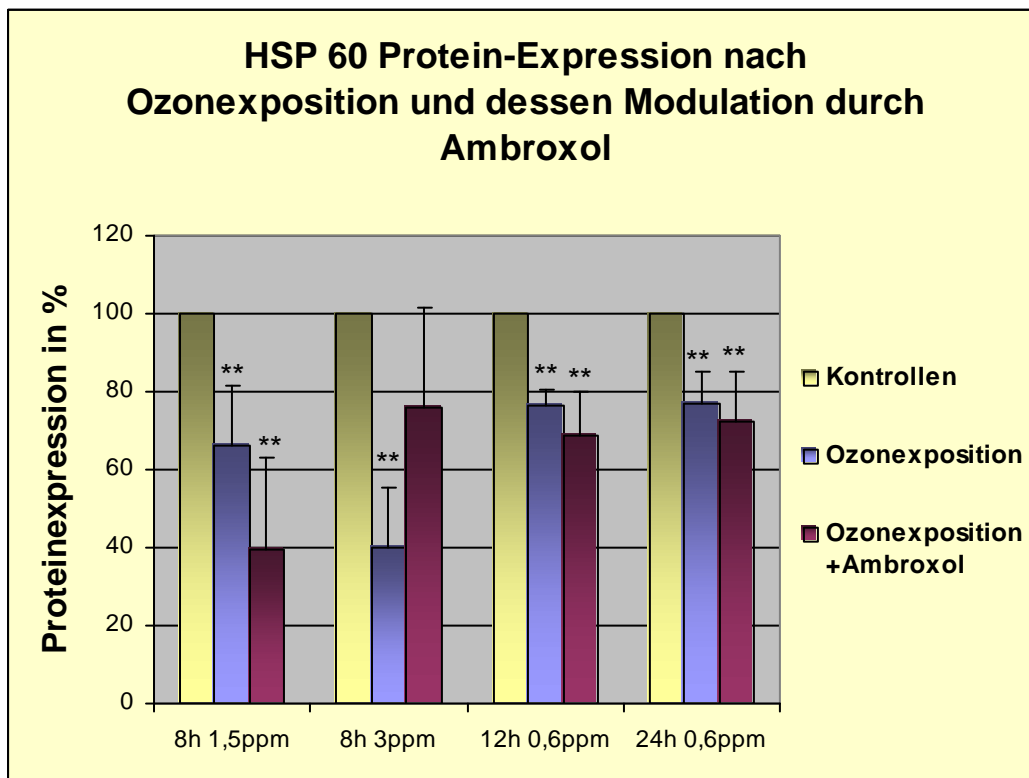


Abbildung 4-20

## b) PCR

Die zusätzliche Gabe von Ambroxol übte nur bei Ozonexposition mit 8h 3ppm und 24h 0,6ppm eine signifikante Wirkung aus, indem es die HSP 60 m-RNA Expression von 108,1% auf 88% (8h 3ppm+A,  $p_A=0,0334$ ) sowie von 56,3% auf 40,5% (24h 0,6ppm+A,  $p_K<0,0001$   $p_A =0,0434$ ) verminderte. (s. Abb. 4-21). Bei den anderen Gruppen war keine signifikante Modulation durch Ambroxol nachweisbar (8h 1,5ppm+A: 88,8%, 12h 0,6ppm+A: 86,6%).

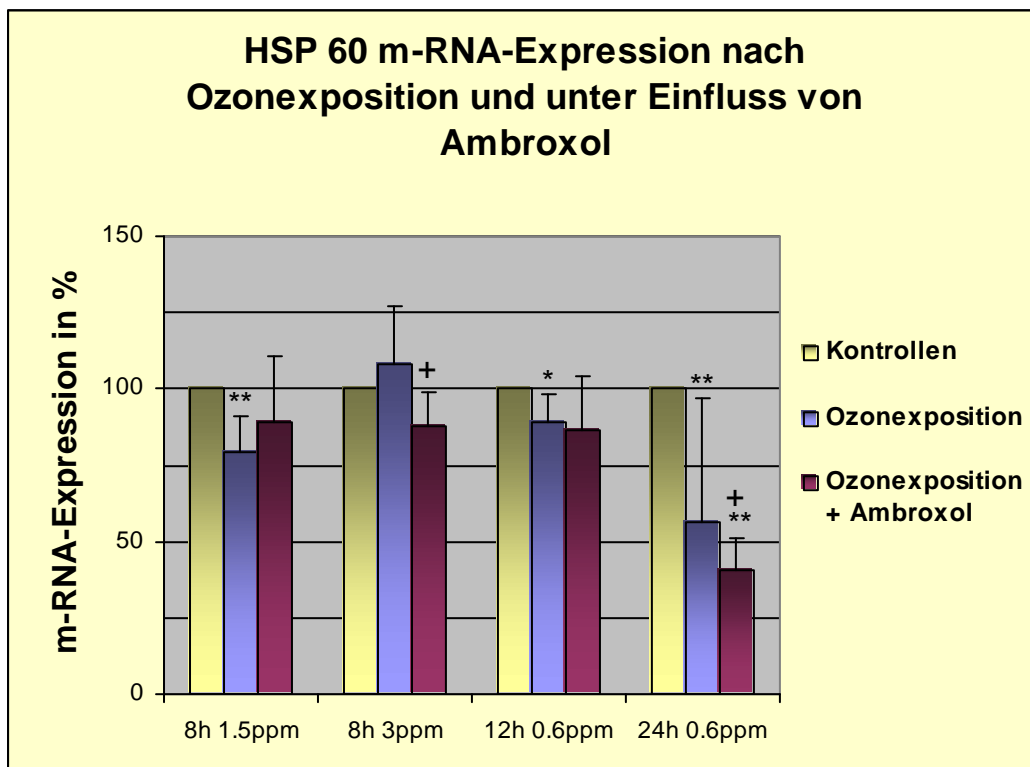


Abbildung 4-21

### 5 Diskussion

#### 5.1 Auswirkungen von Ozon auf die HSP-Expression

##### 5.1.1 HSP 32

In der vorliegenden Arbeit verursachte die Ozon-Exposition von Ratten einen deutlichen HSP 32-Anstieg im Lungengewebe. Diese Beobachtung steht im Einklang mit mehreren Studien, die ebenfalls eine HSP 32-Induktion durch oxidativ wirkende Substanzen feststellten. Ozon stellte dabei neben Wasserstoffperoxid, Hyperoxie und UV-Strahlung (Choi und Alam 1996), (Lee et al. 1996) einen typischen Auslöser der HSP 32-Antwort dar (Hamilton et al. 1998). Die Beobachtung, dass das HSP 32 Protein bei 8h 3ppm Ozon stärker als bei 8h 1,5ppm exprimiert wurde, weist auf eine Konzentrationsabhängigkeit hin. Zudem spricht die verstärkte Proteinexpression bei zunehmender Expositionsdauer (360% bei 8h bis zu 989% bei 24h) für eine Zeitabhängigkeit. Diese Theorie wird durch eine Studie von Takahashi und Mitarbeiter erhärtet, in der bei 1 bis 7tägiger Exposition von Ratten mit 0,4ppm Ozon ein kontinuierlicher Anstieg der HSP 32 m-RNA beobachtet wurde. Dieser war ab dem 3. Tag signifikant ausgeprägt und verstärkte sich weiter bis zum 7. Tag der Exposition. Takahashi et al. postulierten daher, dass es sich bei der HSP 32 Expression nicht um eine akute Stressreaktion, sondern eher um eine länger anhaltende Stressantwort handelt (Takahashi et al. 1997).

In der vorliegenden Studie wurde zudem ein HSP 32 m-RNA Anstieg festgestellt. Hier war die HSP 32 m-RNA-Erhöhung schon bei kürzerer Exposition als bei Takahashi et al. zu beobachten. Dieser Unterschied ist möglicherweise durch die Verwendung höherer Ozonkonzentrationen (0,6, 1,5 und 3ppm vs. 0,4ppm bei Takahashi et al.) verursacht, die bereits bei kürzerer Expositionsdauer einen HSP-Anstieg verursachen könnten. Bei Takahashi et al. wurden Expositionszeiten von 8 und 12 Stunden nicht untersucht, sodass nicht auszuschließen ist, dass auch dort ein HSP 32 m-RNA

Anstieg stattgefunden hat. Takahashi et al. lassen bei ihrer Interpretation zudem außer Acht, daß eine verzögerte mRNA-Regulation nach sofortigem Protein-Anstieg möglich sein könnte.

Im Gegensatz zu der Studie von Takahashi et al., in der die HSP 32-mRNA-Expression nach 1 bis 7tägiger Exposition kontinuierlich anstieg (s.o.), war in der vorliegenden Arbeit zunächst eine hochsignifikante Induktion zu beobachten (267%), die im weiteren zeitlichen Verlauf wieder rückläufig war (121% nach 24h). In beiden Studien wurden unterschiedliche Expositionszeiträume (in der vorliegenden Arbeit 8-24h vs. 24h bis 7d bei Takahashi et al.) und Ozonkonzentrationen (0,6, 1,5 und 3ppm vs. 0,4ppm bei Takahashi et al.) untersucht, von daher lassen sich die Ergebnisse nicht vollständig miteinander vergleichen. Unter Berücksichtigung der Resultate beider Studien kann postuliert werden, dass die HSP 32-mRNA nach Ozonexposition zuerst kurzfristig ansteigt, um bei weiterer Exposition wieder abzufallen. Wie sich die Unterschiede hinsichtlich der mRNA Expression erklären und ob ggf. in der vorliegenden Versuchsanordnung eine erneute mRNA Induktion bei längerer Exposition zu beobachten gewesen wäre, kann an Hand der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Die Daten der vorliegenden Studie sprechen allerdings für einen negativen Feed-back Mechanismus: Die bei kurzer Exposition (8h) stark erhöhte HSP 32 mRNA fiel bei längerer Expositionsdauer (12-24h) bis auf das Kontrollniveau ab, während das HSP 32 Protein mit zunehmender Expositionsdauer kontinuierlich anstieg. Der negative Feed-back Mechanismus würde somit erfordern, dass bei einem Mangel an HSP 32 (z.B. im Falle eines oxidativen Stresses) oder großem Proteinbedarf eine Induktion der HSP 32 mRNA erfolgt. Diese wäre wiederum rückläufig, wenn wieder ausreichend HSP 32 Protein vorhanden ist.

Im Gegensatz zu den oben genannten Beobachtungen stellten Cosma und Mitarbeiter bei Ratten, die 6h 0,5ppm bzw. 1ppm Ozon ausgesetzt waren, keine Veränderung der HSP 32 mRNA Expression im nicht-lavagiertem Gesamtlungengewebe fest (Cosma et al. 1992). Allerdings verwendeten sie bei (im Vergleich zur vorliegenden Arbeit) ähnlichen Expositionszeiten deutlich geringere Ozonkonzentrationen (0,5/1ppm für 6h vs. 1,5/3ppm für 8h). In der vorliegenden Arbeit wurde die Exposition zudem wesentlich länger durchgeführt (0,6ppm für 12/24h). Möglicherweise ist zur HSP 32-Induktion eine Ozonexposition von längerer Dauer und/oder eine höherer Ozonkonzentration als 6h 0,5ppm bzw. 1ppm erforderlich.

### 5.1.2 HSP 70

Die in dieser Arbeit beobachtete HSP 70 m-RNA-Expression (gemessen in der PCR) war stark von der Ozon-Expositionsdauer abhängig. Während kürzere Expositionen (8 und 12h) einen hochsignifikanten Anstieg der HSP 70 m-RNA bewirkten, war nach längerer Exposition (24h) kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen feststellbar. Unsere Beobachtungen sind vereinbar mit der Hypothese von DeMaio, nach der es sich bei der HSP 70 Expression um eine schnell verfügbare und kurzfristige Stressantwort handelt (DeMaio 1999). Das HSP 70-Protein nach Ozonexposition war hingegen in der vorliegenden Studie im Vergleich zu den Kontrollen deutlich vermindert, wobei der stärkste Abfall bei den kürzeren Expositionen (8 und 12h) stattfand. In anderen Studien wurde indessen eine ozonbedingte HSP 70-Erhöhung beschrieben (Su und Gordon 1997), (Hamilton et al. 1996), (Hamilton et al. 1998). So lösten kurzzeitige Ozonexpositionen eine HSP 70 Erhöhung sowohl in lavagiertem Gesamtlungengewebe und der BAL des Meerschweinchens (6h 0,6ppm) (Su and Gordon 1997) als auch in humanen

Alveolarmakrophagen (1h 0,25 u. 0,4ppm) (Hamilton et al. 1998), (Hamilton et al. 1996) aus. Zudem bewirkte eine chronische Ozonexposition (in vivo, diskontinuierlich mit 0,15ppm über 40 Wochen) eine gegenüber den Kontrollen verstärkte HSP 70 Expression in Ratten-Gesamtlungen (Wong et al. 1996). Die genannten Studien untersuchten allerdings andere Spezies sowie unterschiedliche Ozonkonzentrationen und Expositionszeiten. Daher lassen sich diese Ergebnisse nicht vollständig miteinander vergleichen. Wu et al. beobachteten bei der in vivo Exposition von Affen (0,98ppm Ozon für 1d) kongruent zu den vorliegenden Ergebnissen einen Abfall dieses Stressproteins: Mittels immunohistochemischer Färbung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern wiesen sie nach eintägiger Exposition eine deutliche Verminderung des HSP 70 nach (Wu et al. 1999). Für diesen – auch in der vorliegenden Arbeit beobachteten - HSP 70 Abfall nach Ozonexposition, gibt es verschiedene Erklärungen:

- 1) HSP 70 übt wichtige Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Zellfunktion in Stresssituationen aus. So führt es beispielsweise denaturierte Polypeptide in ihre ursprüngliche Form zurück und vermindert so deren Anhäufung in der Zelle (Wong und Wispe 1997). Die - besonders bei kürzeren Expositionszeiten von 8 und 12h - vermehrte HSP 70 mRNA weist auf eine erhöhte Transkription des HSP 70 Gens und damit auf eine verstärkte Bildung des HSP 70 Proteins hin. Allerdings zeigte sich eine signifikante Verminderung des HSP 70-Proteins. Vermutlich kommt es unter zellulärem Stress zu einem vermehrten Verbrauch von HSP 70, das daher in den vorliegenden Untersuchungen nur noch vermindert nachweisbar war.
- 2) In seiner Funktion als molekulares Chaperon bindet das HSP 70 Protein an entstehende sowie beschädigte Proteine (Wong und Wispe 1997). Eventuell

kann dieser HSP-Protein-Komplex nicht durch die in dieser Arbeit verwendeten Detektions-Antikörper gebunden und somit ein HSP 70-Anstieg nicht mehr nachgewiesen werden.

- 3) Es ist denkbar, dass die verstärkte HSP 70 Protein-Expression größtenteils in den inflammatorischen Zellen (vorwiegend Alveolarmakrophagen) stattfindet, die bei der Ozon-induzierten Entzündungsreaktion vermehrt in das Lumen der Alveolen und Bronchiolen einwandern. Da diese durch das gründliche Lavagieren der Lungen teilweise entfernt worden sind, wäre hierdurch der fehlende HSP 70 Anstieg (im Gegensatz zu anderen Studien (s.o.)) erklärbar (Wu et al. 1999).

### 5.1.3 HSC 70

In der vorliegenden Studie zeigte das HSC 70 Protein nach Ozonexposition einen zeit- und konzentrationsabhängigen Expressionsabfall. Dieser war nach 8 und 12h hochsignifikant ausgeprägt und normalisierte sich nach 24stündiger Exposition wieder. Zudem fiel die HSC 70-Expression bei höherer Ozonkonzentration stärker ab (9,3% bei 8h 3ppm vs. 61,7% bei 8h 1,5ppm). Für den ozonbedingten HSC 70-Abfall ist folgende Erklärung möglich: Das HSC 70 stellt die konstitutive Form der HSP 70 Familie dar und wird fast ausschließlich unter physiologischen Bedingungen exprimiert (Wong und Wispe 1997). In einer Stress-Situation findet allerdings in der Zelle eine Prioritätensetzung der Genexpression statt, d.h. die Transkription der Stress-induzierbaren Gene wird gesteigert und im Gegenzug die der anderen Gene gedrosselt (Wong und Wispe 1997), (Wischmeyer 2002). Möglicherweise wird bei Ozoneinfluss auch die Transkription des HSC 70 Gens zugunsten der Produktion

stressinduzierbarer HSPs (z.B. HSP 70) gehemmt.

Ein ozonbedingter HSC 70-Abfall wurde auch von Wu et al. festgestellt. Sie zeigten bei ozonexponierten Affenlungen (0,98ppm Ozon für 8h an 1 bzw. 90 d) eine deutlich verminderte immunhistochemische Anfärbung des HSC 70 Proteins (Wu et al. 1999). Diese Beobachtungen stehen allerdings im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Su et al., die nach Ozon-Exposition in vivo (6h mit 0,4 bzw. 0,66ppm beim Meerschweinchen) keine Abweichung des HSC 70 Proteins im Gesamtlungengewebe oder in der BAL beobachteten (Su und Gordon 1997). Allerdings wurden in dieser Studie andere Spezies, eine kürzere Expositionszeit (6h vs. 8, 12 und 24h) und eine zum Teil geringere Ozonkonzentration (0,66ppm vs. 0,6, 1,5 und 3ppm) untersucht. Möglicherweise sind zur Hemmung der HSC 70-Expression längere Expositionszeiten und/oder höhere Ozonkonzentrationen vonnöten. Eine weitere Erklärung könnte in einer höheren Stressresistenz von Meerschweinchen gegenüber Ratten liegen.

### 5.1.4 HSP 60

Das HSP 60 Protein zeigte bei allen Konzentrationen und Expositionszeiten einen hochsignifikanten Abfall. Dieser wies eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit auf, da die 8stündiger Exposition mit 3ppm Ozon das HSP 60-Protein noch stärker verminderte als 8h mit 1,5ppm (40,2% vs. 66,3%). Auch die HSP 60 mRNA war bis auf eine Ausnahme (keine Veränderung bei 8h 3ppm) bei allen Gruppen signifikant bis hochsignifikant vermindert. Wu et al. stellten bei Ozon-Exposition in vivo (0,98ppm) ebenfalls eine Verminderung des HSP 60 Proteins fest. Diese war bei längerer Exposition (90d) stärker ausgeprägt als bei der kürzeren (1d) (Wu et al. 1999). Die HSP 60 Familie übt eine wichtige Funktion als molekulares Chaperon aus, indem es die Faltung neu entstehender Proteine katalysiert und bei der Bildung von Proteinkomplexen assistiert (Minowada et al. 1995) Eine mögliche Ursache des

verminderten HSP 60 Nachweises könnte (wie auch bei HSP 70) in einer verminderten Detektion durch Komplexbildung oder durch einen Verbrauch (s. Kap. 5.1.2) des HSP 60 in einer Stressreaktion liegen. Sowohl die Studie von Wu et al. als auch die vorliegende Arbeit zeigten nach Ozon-Expositionen eine verminderte HSP 60-Expression. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem eine verminderte HSP 60 mRNA-Expression beobachtet. Die Kombination aus vermindertem Protein und verringerter mRNA spricht für eine ozonbedingte Hemmung der Transkription bzw. der HSP 60 Proteinsynthese. Somit scheint HSP 60 in der ozoninduzierten Stressantwort eine untergeordnete Rolle zu spielen. Eine relevante Induktion von HSP 60 durch oxidativen Stress wurde bislang nicht beschrieben. Möglicherweise erklärt sich der HSP 60 Abfall durch Prioritätensetzung, in der die HSP 60-Proteinsynthese zugunsten der Stressantwort anderer HSPs (z. B. HSP 32) gedrosselt wird.

### 5.2 Auswirkung von Ambroxol auf die Ozon-induzierte HSP-Expression

Bisher liegen in der Literatur keine Erkenntnisse über den Einfluss von Ambroxol auf die HSP-Expression vor. In der vorliegenden Studie hatte Ambroxol eine deutliche Auswirkung auf die ozoninduzierte HSP-Expression der 8h 3ppm+A-Gruppe. In den anderen Gruppen (8h 1,5ppm+A, 12h 0,6ppm+A und 24h 0,6ppm+A) war hingegen nur wenig Modulation durch Ambroxol feststellbar. Diese selektive Ambroxolwirkung ist anscheinend auf die hohe Ozonkonzentration (3ppm) zurückzuführen, da sich bei der 8stündigen Exposition mit 1,5ppm zumeist keine Veränderungen durch Ambroxol zeigten.

### 5.2.1 HSP 32

Die Ambroxolgabe verminderte in der 8h 3ppm+A-Gruppe die durch Ozon verursachte HSP 32-Antwort und bewirkte somit eine Annäherung der Proteinexpression an das Kontrollniveau. Da die HSP-Expression als Parameter für einen stattgefundenen zellulären Stress angesehen werden kann (Hamilton und Li 1998), legt die ambroxolbedingte Hemmung der HSP 32-Expression eine protektive Funktion dieser Substanz nahe. Da Ambroxol bekannte antioxidative Eigenschaften besitzt (Winsel 1992), könnte der direkte Stress der Zellen gemindert und so die notwendige HSP 32-Expression reduziert werden. Einzuwenden wäre allerdings, daß eine vermehrte HSP-Produktion zu einer sekundär erhöhten Stress-Toleranz und somit zu einer verstärkten Zytoprotektion gegenüber einer Vielzahl von Stress-Faktoren führt. Die verminderte HSP 32 Expression unter Ambroxol könnte so sekundär die Stresstoleranz reduzieren. Diese Möglichkeit ist weitestgehend theoretisch und es ist eher anzunehmen, dass Ambroxol eine primäre Reduktion des zellulären oxidativen Stresses bewirkt und so die Zellen primär schützt.

Bei 8h 1,5ppm+Ambroxol wurde eine signifikante Verminderung der HSP 32 mRNA nachgewiesen. Die somit verringerte Transkriptionsaktivität des HSP 32-Stressproteins weist auf die mögliche protektive Bedeutung des Ambroxols hin (s. o.). Allerdings stehen diese Beobachtungen im Gegensatz zu den Ergebnissen der 8h 3ppm+A - Gruppe, die in der PCR eine signifikante Erhöhung der HSP 32 mRNA zeigte. Dafür ist folgende Erklärung denkbar: Möglicherweise stellt Ambroxol bei Exposition mit einer höheren Ozondosis (3ppm) doch einen Expressionsreiz für HSP 32 dar (zu sehen in der vermehrten m-RNA-Bildung und folglich gesteigerten Transkription). Das sich dieser nicht in der Proteinkonzentration niederschlägt, könnte durch die zeitliche Latenz bedingt sein, in der die HSP 32 mRNA im Rahmen der Translation in das HSP 32 Protein umgewandelt wird.

Die protektive und therapeutische Wirkung des Ambroxols wurde in der Literatur vielfach beschrieben. Beispiele hierfür sind die Prophylaxe des akuten Lungenversagens (ARDS und IRDS) und postoperativer Atelektasen (Romanini et al. 1986), (Mezzetti et al. 1990) sowie die Behandlung chronisch-entzündlicher Lungenerkrankungen wie dem Asthma bronchiale und der COPD (Winsel 1992), (Ericsson et al. 1987), (Olivieri et al. 1987) (s. auch Kap.2.2.4). Ambroxol wirkt sowohl antioxidativ, indem es die ROS-Freisetzung hemmt und als Radikalfänger fungiert (Gillissen et al. 1997), (Felix et al. 1996) als auch antiinflammatorisch durch Hemmung entzündungsfördernder Mediatoren wie IL-1, TNF und Phospholipase A (Gillissen und Nowak 1998), (Bianchi et al. 1990) (s. auch Kap. 2.2.2 und 2.2.3). Da Ozon neben oxidativen Stress auch eine akute Entzündungsreaktion auslöst, könnten beide Mechanismen von Bedeutung sein. Die Beobachtung, dass HSP 32 - typischerweise induzierbar durch oxidativen Stress - von allen untersuchten HSPs am stärksten durch Ambroxol beeinflusst wird, spricht für die antioxidative Wirkung. Inwieweit auch mögliche antiinflammatorische Eigenschaften eine Rolle spielen, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

### 5.2.2 HSP 70

Das zusätzlich zur Ozonexposition applizierte Ambroxol verursachte bei der 8h 3ppm+A Gruppe eine deutliche Erhöhung sowohl des HSP 70-Proteins als auch der mRNA. Auch bei 12h 0,6ppm+Ambroxol wurde eine im Vergleich zur alleinigen Ozonexposition erhöhte HSP 70 Protein-Expression beobachtet. HSP 70 faltet bei der Einwirkung von Stress die vermehrt anfallenden denaturierten Polypeptide in ihre ursprüngliche Form zurück und spielt so eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellfunktion. Die HSP 70 Induktion in Stresssituationen wäre folglich ein weiterer

Mechanismus, der (neben der mukolytischen, anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Funktion) die protektiven Auswirkungen des Ambroxols (s. Kap. 2.2.4) erklären würde.

### 5.2.3 HSC 70

Ähnlich der HSP 70-Ergebnisse wurde auch bei HSC 70 eine verstärkte Expression durch zusätzliche Ambroxolgabe beobachtet. Diese war bei der 8h 3ppm+A Gruppe sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene signifikant ausgeprägt. HSC 70 wird als die konstitutive Form der HSP 70 Familie fast ausschließlich unter physiologischen Bedingungen exprimiert. Bei zellulärem Stress wird seine Expression im Rahmen einer Prioritätensetzung zugunsten der Synthese der stressinduzierten HSPs gehemmt. Möglicherweise hebt Ambroxol diese Hemmung auf und gewährleistet so auch in Stresssituationen eine vermehrte Bildung des Chaperons HSC 70.

### 5.2.4 HSP 60

Im Gegensatz zu HSP 70 und HSC 70, bei denen Ambroxol eine verstärkte mRNA-Expression bewirkte, wies die HSP 60-mRNA in den Gruppen 8h 3ppm+A und 24h 0,6ppm+A eine signifikante Expressions-Verminderung auf. Diese wirkte sich allerdings nicht auf die Proteinexpression aus. Möglicherweise tritt bei HSP 60 eine kompensatorische Hemmung der Transkription auf, die durch die Ambroxol-bedingte Stimulation anderer Stressproteine (z.B. die der HSP 70 Familie (s. Kap. 5.2.2 und 5.2.3)) bedingt sein könnte. Allerdings scheint die Transkriptionsminderung nicht sehr gravierend zu sein, da sie sich nicht in einer verminderten Proteinexpression widerspiegelt.

### 5.3 Wirkung alleiniger Ambroxolgabe auf HSP-Expression

Eine alleinige Ambroxolgabe bewirkte bei Ratten, die nach der Applikation 12 bzw. 24 Stunden Raumluft ausgesetzt waren (12h A und 24h A) einen hochsignifikanten HSP 32-Anstieg. Bei der 8h A-Gruppe hingegen war keine signifikante Veränderung gegenüber den Kontrollen feststellbar. Möglicherweise liegt ein HSP 32-stimulierender Effekt des Ambroxols vor, der anscheinend erst nach längerer Wirkungsdauer beginnt (12-24h). Andererseits kann an Hand der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden, daß Ambroxol in der vorliegenden Dosierung einen toxischen Effekt hat, der zu einem zellulären Stress mit HSP 32-Anstieg führt. Ein weiteres Erklärungsmodell stützt sich auf die Tatsache, dass sowohl HSP 32 als auch Ambroxol antioxidative Eigenschaften besitzen. Möglicherweise kann Ambroxol einige der antioxidativen Funktionen des HSP 32 im Zellhaushalt übernehmen, so dass weniger HSP 32 verbraucht und es somit vermehrt nachweisbar wäre. Dafür spricht auch, dass in der PCR keine Erhöhung der mRNA beobachtet wurde und somit eine erhöhte Transkription nicht nachweisbar ist.

Bei HSP 70 bewirkte eine alleinige Ambroxolapplikation in der 12h A-Gruppe eine signifikante Verminderung des Proteins sowie der mRNA. In der 8h A-Gruppe war die HSP 70 mRNA ebenfalls signifikant reduziert. Möglicherweise tritt unter stressfreien Bedingungen eine HSP 70 Hemmung unter Ambroxol auf, während es in einer Stresssituation (z.B. durch Ozon) mit zusätzlicher Ambroxolgabe zu einer HSP 70 Expression kommt (s. Kap. 5.2.2).

Die Ambroxolgabe hatte auf Proteinebene keine modulierende Wirkung auf HSC 70. Allerdings zeigte sich bei der 24h A-Gruppe eine Verminderung der HSC 70 mRNA. Möglicherweise tritt nach längerer Wirkungsdauer (24h) eine Hemmung der Transkription auf, die sich auf Proteinebene aber erst später bemerkbar macht. Bei HSP 60 zeigte sich in der 12h A-Gruppe eine Verminderung auf mRNA- und in der 24h A-Gruppe auf Proteinebene. Auch hier sprechen die Ergebnisse für eine ambroxolbedingte Hemmung nach längerer Wirkdauer, wobei sich der Effekt auf das HSP 60 Protein anscheinend erst mit einer Latenz auswirkt.

Insgesamt weisen die vorliegenden Ergebnisse auf einen sehr unterschiedlichen Einfluss von einer Ambroxolgabe auf die verschiedenen Stressproteine hin, sodass keine einheitliche Aussage über die Ambroxolwirkung auf die HSP-Expression möglich ist. Ambroxol scheint die Expression von HSP 70 und HSP 60 zu hemmen, wobei dieses bei HSP 70 nach kürzerer (8 und 12h), bei HSP 60 hingegen erst nach längerer Wirkdauer (12 und 24h) zu beobachten ist. Auffällig ist, dass HSC 70 als konstitutives Stressprotein am wenigsten durch Ambroxolgabe beeinflusst wird. HSP 32 war hingegen nach Ambroxolgabe vermehrt nachweisbar. Dies ist am ehesten dadurch erklärbar, dass Ambroxol als antioxidative Substanz eventuell Funktionen des ebenfalls antioxidativ wirkenden HSP 32 übernimmt, daher weniger HSP 32 verbraucht wird und es somit vermehrt nachweisbar wäre. Um die Ambroxolwirkung auf die HSP-Expression noch weiter zu klären, sind weitere Studien mit anderen Expositionszeiten und verschiedenen Ambroxolkonzentrationen notwendig.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Abbey, D. E., P. K. Mills, F. F. Petersen, W. L. Beeson (1991). "Long-term ambient concentrations of total suspended particulates and oxidants as related to incidence of chronic disease in California Seventh-Day Adventists." Environ Health Perspect 94: 43-50.

Ananthan, J., A. L. Goldberg, R. Voellmy (1986). "Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes." Science 232(4749): 522-4.

Anderson, H. R., C. Spix, S. Medina, J. P. Schouten, J. Castellsague, G. Rossi, D. Zmirou, G. Touloumi, B. Wojtyniak, A. Ponka, L. Bacharova, J. Schwarz, K. Katsouyanni (1997). "Air pollution and daily admissions for chronic obstructive pulmonary disease in 6 European cities: results from the APHEA project." Eur Respir J 10(5): 1064-71.

Aris, R. M., D. Christian, P. Q. Hearne, K. Kerr, W. E. Finkenbeiner, J. R. Balmers (1993). "Ozone-induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy." Am Rev Respir Dis 148(5): 1363-72.

Avol, E. L., W. S. Linn, T. G. Venet, D. A. Shamoo, J. D. Hackney (1984). "Comparative respiratory effects of ozone and ambient oxidant pollution exposure during heavy exercise." J Air Pollut Control Assoc 34(8): 804-9.

Beere, H. M., B. B. Wolf, K. Cain, G. M. Cohen, D. R. Green (2000). "Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome." Nat Cell Biol 2: 469-75.

Bellmann, K., M. Jäättelä, D. Wissing, V. Burkart, H. Kolb (1996). "Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide." FEBS Lett 391: 185-88.

Berry, M., P. J. Lioy, K. Gelperin, G. Buckler, J. Klotz (1991). "Accumulated exposure to ozone and measurement of health effects in children and counselors at two summer camps." Environ Res 54(2): 135-50.

Bhalla, D. K. (1999). "Ozone-induced lung inflammation and mucosal barrier disruption: toxicology, mechanisms, and implications." J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2(1): 31-86.

Bianchi, M., A. Mantovani, A. Erroi, C. A. Dinarello, P. Ghezzi (1990). "Ambroxol inhibits interleukin 1 and tumor necrosis factor production in human mononuclear cells." Agents Actions 31(3-4): 275-9.

Blomberg, A., I. S. Mudway, C. Nordenhall, H. Hedenstrom, F. J. Kelly, A. J. Frew, S. T. Holgate, T. Sandstrom (1999). "Ozone-induced lung function decrements do not correlate with early airway inflammatory or antioxidant responses." Eur Respir J 13(6): 1418-28.

Bonay, M., P. Soler, M. Riquet, J. P. Bassesti, A. J. Hance, A. Tazi (1994). "Expression of heat shock proteins in human lung and lung cancers." Am J Respir Cell Mol Biol 10: 453-61.

Brandes, M. E. and J. N. Finkelstein (1989). "induction of the stress response by isolation of rabbit type 2 pneumocytes." Exp Lung Res 15(1): 93-111.

Bromberg, P. A. and H. S. Koren (1995). "Ozone-induced human respiratory dysfunction and disease." Toxicol Lett 82-83: 307-16.

Cegla, U. H. (1988). "Long-term therapy over 2 years with ambroxop (Mucosolvan) retard capsules in patients with chronic bronchitis. Results of a double-blind study of 180 patients." Prax Klin Pneumol 42: 715-21.

Cerutti, P. and Y. Kapanci (1979). "Effects of metabolite 8 of bromexine (Na 872) on type 2 epithelium of the lung: an experimental and morphological study with reference to surfactant d´secretion." Respiration 37: 241-51.

Chang, L. Y., Y. Huang, B. L. Stockstill, J. A. Graham, E. C. Grose, M. G. Menache, F. J. Miller, D. L. Costa, J. D. Crapo (1992). "Epithelial injury and interstitial fibrosis in the proximal alveolar regions of rats chronically exposed to a simulated pattern of urban ambient ozone." Toxicol Appl Pharmacol 115(2): 241-52.

Chitano, P., A. Di Stefano, S. Finotto, G. Zavattini, P. Maestrelli, C. Mapp, L. M. Fabbri, L. Allegra (1989). "Ambroxol inhibits airway hyperresponsiveness induced by ozone in dogs." Respiration 55(Suppl 1): 74-8.

Choi, A. M. and J. Alam (1996). "Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury." Am J Respir Cell Mol Biol 15(1): 9-19.

Christian, D. L., L. L. Chen, C. H. Scannell, R. E. Ferrando, B. S. Welch, J. R. Balmes (1998). "Ozone-induced inflammation is attenuated with multiday exposure." Am J Respir Crit Care Med 158(2): 532-7.

Clements, J. A. and D. F. Tierney (1965). Alveolar instability associated with altered surface tension. Handbook of Physiology - Respiration. W. O. Fenn and H. Rahn. Washington, American Physiological Society. 2: 1565-83.

Cohen, D. S., E. Palmer, W. J. Welch, D. Sheppard (1991). "The response of guinea pig airway epithelial cells and alveolar macrophages to environmental stress." Am J Respir Cell Mol Biol 5(2): 133-43.

Cosma, G., H. Fulton, T. DeFeo, T. Gordon (1992). "Rat lung metallothionein and heme oxygenase gene expression following ozone and zinc oxide exposure." Toxicol Appl Pharmacol 117(1): 75-80.

Degterev, A. (2003). "A decade of caspases." Oncogene 22: 8543-67.

Delfino, R. J., M. R. Becklake, J. A. Hanley (1994). "The relationship of urgent hospital admissions for respiratory illnesses to photochemical air pollution levels in Montreal." Environ Res 67(1): 1-19.

DeMaio, A. (1999). "Heat shock proteins: facts, thoughts and dreams." Shock 11: 1-12.

Devlin, R. B., W. F. McDonnell, R. Mann, S. Becker, D. E. House, D. Schreinemachers, H. S. Koren (1991). "Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung." Am J Respir Cell Mol Biol 4(1): 72-81.

Di Felice, V., S. David, F. Cappello, F. Farina, G. Zummo (2005). "Is clamydial heat shock protein 60 a risk factor for oncogenesis?" Cell Mol Life Sci 62: 4-9.

Dockery, D. W., C. A. Pope, 3rd, X. Xu, J. D. Spengler, J. H. Ware, M. E. Fay, B. G. Ferris, F. E. Speizer (1993). "An association between air pollution and mortality in six U.S. cities." N Engl J Med 329(24): 1753-9.

Duan, X., A. R. Buckpitt, K. E. Pinkerton, C. Ji, C. G. Plopper (1996). "Ozone-induced alterations in glutathione in lung subcompartments of rats and monkeys." Am J Respir Cell Mol Biol 14(1): 70-5.

Ericsson, C. H., J. Juhasz, E. Jonsson, B. Mossberg (1987). "Ambroxol and simple chronic bronchitis. Effects on subjective symptoms and ventilatory function." Respiration 51(Suppl 1): 33-6.

Fakhrzadeh, L., J. D. Laskin, D. L. Laskin (2002). "Deficiency in inducible nitric oxide synthase protects mice from ozone-induced lung inflammation and tissue injury." Am J Respir Cell Mol Biol 26: 413-19.

Falbe, J. (1998). Römpp Lexikon Chemie, Thieme: 3086-88.

Felix, K., M. Pairet, R. Zimmermann (1996). "The antioxidative activity of the mucoregulatory agents: ambroxol, bromhexine and N-acetyl-cysteine. A pulse radiolysis study." Life Sci 59: 1141-47.

Fernandes, M., T. O'Brian, J. T. Lis (1994). Structure and regulation of heat shock gene promoters. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. R. I.

Morimoto, A. Tissiers and C. Georgopoulos, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 375-93.

Folinsbee, L. J., J. F. Bedi, S. M. Horvath (1980). "Respiratory responses in humans repeatedly exposed to low concentrations of ozone." Am Rev Respir Dis 121(3): 431-9.

Gabai, V. L., A. B. Meriin, J. A. Yaglom, V. Z. Volloch, M. Y. Sherman (1998). "Role of HSP70 in regulation of stresskinase JNK: implications for apoptosis and aging." FEBS Lett 43: 1-4.

Germouty, J. and J. L. Jirou-Najou (1987). "Clinical efficacy of ambroxol in the treatment of bronchial stasis. Clinical trial in 120 patients at two different doses." Respiration 51(Suppl 1): 37-41.

Gillissen, A., A. Bartling, S. Schoen, G. Schulze-Werninghaus (1997). "Antioxidant function of ambroxol in mononuclear and polymorphonuclear cells in vitro." Lung 175: 235-42.

Gillissen, A. and D. Nowak (1998). "Characterisation of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy." Respir Med 92: 609-23.

Gupta, S. and A. A. Knowlton (2005). "HSP60, Bax, Apoptosis and the Heart." J Cell Mol Med 9(1): 51-58.

Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease ." Am. J. Med. 91: (3C)14S-22S.

Halliwell, B. and C. E. Cross (1994). "Oxygen-derived species:their relation to human diseases and environmental stress." Environ Health Perspect 102 Suppl: 5-12.

Hamilton, R. F., Jr., M. E. Hazbun, C. A. Jumper, W. L. Eschenbacher, A. Holian (1996). "4-Hydroxynonenal mimics ozone-induced modulation of macrophage function ex vivo." Am J Respir Cell Mol Biol 15(2): 275-82.

Hamilton, R. F., Jr., L. Li, W. L. Eschenbacher, L. Szveda, A. Holian (1998). "Potential involvement of 4-hydroxynonenal in the response of human lung cells to ozone." Am J Physiol 274(1 Pt 1): L8-16.

Hirvonen, M. R., B. Brune, E. G. Lapetina (1996). "Heat shock proteins and macrophage resistance to the toxic effect of nitric oxide." Biochem J 315: 845-49.

Hong, J. S., H. H. Ko, E. S. Han, C. S. Lee (2003). "Inhibition of bleomycin-induced cell death in rat alveolar macrophages and human lung epithelial cells by ambroxol." Biochem Pharmacol 66: 1297-306.

Horvarth, I., W. MacNee, F. J. Kelly, P. N. Dekhuijzen, M. Phillips, G. Göring, A. M. Choi, M. Yamaya, F. H. Bach, D. Willis, L. E. Donnerly, K. F. Chung, P. J. Barnes (2001). "'Haemoxigenase-1 induction and exhaled markers of oxidative stress in lung diseases", summary of the ERS Research Seminar in Budapest, Hungary, September 1999." Eur Respir J 18: 420-30.

Horvath, S. M., J. A. Gliner, L. J. Folinsbee (1981). "Adaptation to ozone: duration of effect." Am Rev Respir Dis 123(5): 496-9.

Inoue, H., H. Aizawa, H. Nakano (2000). "Nitric oxide synthase inhibitors attenuate ozone-induced airway inflammation in guinea pigs." Am J Respir Care Med 161: 249-256.

Jäättelä, M. (1999). "Heat shock proteins as cellular lifeguards." Ann Med 31(4): 261-71.

Jäättelä, M., D. Wissing, K. Kikolm, T. Kallunki, M. Egeblad (1998). "HSP70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases." EMBO 17: 6124-34.

Javadpour, M., C. J. Kelly, G. Chen, K. Strokes, A. Leahy, D. J. Bouchier-Hayes (1998). "Thermotolerance induces heat shock protein 72 expression and protects against ischaemia-reperfusion-induced lung injury." Br J Surg 85: 943-46.

Jorres, R., D. Nowak, H. Magnussen (1996). "The effect of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis." Am J Respir Crit Care Med 153(1): 56-64.

Kindas-Mügge, I., W. R. Pohl, E. Zavadova, H. D. Kohn, S. Fitzal, F. Kummer, M. Micksche (1996). "Alveolar macrophages of patients with adult respiratory distress syndrome express high levels of heat shock protein 72 mRNA." Shock 5: 184-89.

King, R. J. (1982). "Pulmonary surfactant." J Appl Physiol 53: 1-8.

Kirchhoff, S. R., S. Gupta, A. A. Knowlton (2002). "Cytosolic HSP60, Apoptosis and Myocardial injury." Circulation 105: 2899-2904.

Kirichenko, A., L. Li, M. T. Morandi, A. Holian (1996). "4-hydroxy-2-nonenal-protein adducts and apoptosis in murine lung cells after acute ozone exposure." Toxicol Appl Pharmacol 141(2): 416-24.

Koh, Y., C. M. Lim, M. J. Kim, T. S. Shim, S. D. Lee, W. S. Kim, D. S. Kim, W. D. Kim (1999). "Heat shock response decreases endotoxin-induced acute lung injury in rats." Respirology 4(4): 325-30.

Kusher, D. I., C. F. Ware, L. R. Gooding (1990). "Induction of the heat shock response protects cells from lysis by tumor necrosis factor." J Immunol 145: 2925-31.

Laoag-Fernandez, J. B., A. M. Fernandez, T. Maruo (2000). "Antenatal use of ambroxol for the prevention of infant respiratory distress syndrome." J Obstet Gynaecol Res 26: 307-12.

Lee, C. S., Y. Y. Jang, J. S. Song, J. H. Song, E. S. Han (2002). "Ambroxol inhibits peroxynitrite-induced damage of alpha-1-antiproteinase and free radical production in activated phagocytic cells." Pharmacol Toxicol 91: 140-49.

Lee, P. J., J. Alam, S. L. Sylvester, N. Inamdar, L. Otterbein, A. M. Choi (1996). "Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury." Am J Respir Cell Mol Biol 14(6): 556-68.

Lee, P. J., J. Alam, G. W. Wiegand, A. M. Choi (1996). "Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia." Proc Natl Acad Sci U S A 93(19): 10393-8.

Li, C. Y., J. S. Lee, Y. G. Ko, J. I. Kim, J. S. Seo (2000). "Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation." J Biol Chem 275: 25665-71.

Li, G. C., L. G. Li, Y. K. Liu, J. Y. Mak, L. L. Chen, W. M. Lee (1991). "Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene." Proc Natl Acad Sci U S A 88(5): 1681-5.

Lin, K. M., B. Lin, I. Y. Lian, R. Mestril, I. Scheffler, W. H. Dillmann (2001). "Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by stimulated ischemia-reoxygenation." Circulation 103: 1787-92.

Lindquist, S. and E. A. Craig (1988). "The heat-shock proteins." Annu Rev Genet 22: 631-77.

LoCicero, J., 3rd, X. Xu, L. Zang (1999). "Heat shock protein suppresses the senescent lung cytokine response to acute endotoxemia." Ann Thorac Surg 68(4): 1150-3.

Marber, M. S., R. Mestril, S. H. Chi, M. R. Sayen, D. M. Yellon, W. H. Dillmann (1995). "Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury." J Clin Invest 95(4): 1446-56.

Masseyeff, R. (1993). Methods of Immunological Analysis. Weinheim, VCH.

Mayer, M. P. and B. Bukau (2005). "HSP70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism." Cell Mol Life Sci 62: 670-84.

McCormic, P. H., G. Chen, S. Tierney, C. J. Kelly, D. J. Bouchier-Hayes (2003). "Clinically relevant thermal preconditioning attenuates ischemia-reperfusion injury." J Surg Res 109: 24-30.

McKnight, T. L. (1993). Physical geography: A landscape appreciation. New Jersey, USA, Englewood Cliffs.

Melillo, G. and G. Cocco (1986). "Ambroxol decreases bronchial hyperreactivity." Eur J Respir Dis 69(5): 316-20.

Mezzetti, M., L. Colombo, M. G. Marini, V. Crosi, P. Pierfederici, E. Mussini (1990). "A pharmacokinetic Study on Pulmonary Tropism of Ambroxol in Patients under Thoracic surgery." J Emerg Surg Intens Care 13: 179-85.

Minowada, G. and W. J. Welch (1995). "Clinical implications of the stress response." J Clin Invest 95(1): 3-12.

Morishima, N. (2005). "Control of cell fate by HSP70: more than an evanescent meeting." J Biochem (Tokyo) 137(4): 449-53.

Moseley, P. L., D. M. Shasby, M. Brady, G. W. Hunninghake (1984). "Lung parenchymal injury induced by bleomycin." Am Rev Respir Dis 130(6): 1082-6.

Mudway, I. S. and F. J. Kelly (2000). "Ozone and the lung: a sensitive issue." Mol Aspects Med 21(1-2): 1-48.

Müller, B., C. Seifart, P. J. Barth (1998). "Effect of air pollutants on the pulmonary surfactant system." Eur J Clin Invest 28: 762-77.

Mustafa, M. G. (1990). "Biochemical basis of ozone toxicity." Free Radic Biol Med 9(3): 245-65.

Nachtman, J. P., B. R. Hajratwala, H. L. Moon, K. B. Gross, E. S. Wright (1986). "Surface tension measurements of pulmonary lavage from ozone-exposed rats." J Toxicol Environ Health 19: 127-36.

Newton, C. G. and A. Graham (1994). PCR, Spektrum Verlag.

Nissim, I., B. States, M. Hardy, J. Pleasure (1993). "Effect of glutamine on heat-shock-induced mRNA and stress proteins." J Cell Physiol 157: 313-18.

Novak, Z., S. I. Varga, L. Kovacs, A. Pal, L. Pataki, B. Matkivics (1989). "The effects of Oradexone and Ambroxol pretreatment of the oxidative sensitivity of the red blood cells in preterm infants." Clin Chim Acta 182(3): 241-5.

Nowak, D., A. Antczak, M. Krol, P. Bialasiewicz, T. Pietras (1994). "Antioxidant properties of Ambroxol." Free Radic Biol Med 16(4): 517-22.

Nowak, D., T. Pietras, A. Antczak, M. Krol, G. Piasecka (1993). "Ambroxol inhibits endotoxin-induced lipid peroxidation in mice." Pol J Pharmacol 45(3): 317-22.

Olivieri, D., G. Zavattini, G. Tomasini, S. Daniotti, G. Bonsignore, G. Ferrara, N. Carnimeo, R. Chianese, E. Catena, S. Marcatili (1987). "Ambroxol for the prevention of chronic bronchitis exacerbations: long-term multicenter trial. Protective effect of ambroxol against winter semester exacerbations: a double-blind study versus placebo." Respiration 51(Suppl 1): 42-51.

Otterbein, L., S. L. Sylvester, A. M. Choi (1995). "Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1." Am J Respir Cell Mol Biol 13(5): 595-601.

Otterbein, L. E., F. H. Bach, J. Alam, M. Soares, H. Tao Lu, M. Wysk, R. J. Davis, R. A. Flavell, A. M. Choi (2000). "Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the nitrogen-activated protein kinase pathway." Nat Med 6: 422-28.

Otterbein, L. E., J. K. Kolls, L. L. Mantell, J. L. Cook, J. Alam, A. M. Choi (1999). "Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury." J Clin Invest 103(7): 1047-54.

Peden, D. B., B. Boehlecke, D. Hostman, R. Delvin (1997). "Prolonged acute exposure to 0.16 ppm ozone induces eosinophilic airway inflammation in asthmatic subjects with allergies." J Allergy Clin Immunol 100(6 Pt 1): 802-8.

Perdrizet, G. A., H. Kaneko, T. M. Buckley, M. S. Fishman, M. Pleau, L. Bow, R. T. Schweizer (1993). "heat shock and recovery protects renal allografts from warm ischaemic injury and enhances HSP72 production." Transplant Proc 25: 1670-73.

Perdrizet, G. A., M. J. Rewinski, R. T. Schweizer, D. W. Sharp (1994). "Heat shock and recovery protects pancreatic islets from warm ischaemic injury." Transplant Proc 26: 3477-78.

Pittet, J. F., H. Lee, D. Morabito, M. B. Howard, W. J. Welch, R. C. Mackeris (2002). "Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival." J Trauma 52: 611-17.

Plopper, C. G., F. P. Chu, C. J. Haselton, J. Peake, J. Wu, K. E. Pinkerton (1994). "Dose-dependent tolerance to ozone. I. Tracheobronchial epithelial reorganization in rats after 20 months' exposure." Am J Pathol 144(2): 404-20.

Pryor, W. A. and D. F. Church (1991). "Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radicals as mediators of ozone toxicity." Free Radic Biol Med 11(1): 41-6.

Pühler and Regitz (2000). Lexikon Biochemie und Molekularbiologie. Stuttgart, Thieme.

Putman, E. (1996). Effects of ozone inhalation on the pulmonary surfactant system of the rat. Utrecht, Universität Utrecht: 34-36.

Putman, E., A. J. F. Boere, L. van Bree, L. M. van Golde, H. P. Haagsman (1995). "Pulmonary surfactant subtype metabolism is altered after short-term ozone exposure." Toxicol Appl Pharmacol 134: 132-38.

Putman, E., W. Liese, W. F. Voorhout, L. van Bree, L. M. van Golde, H. P. Haagsman (1997). "Short-term ozone exposure affects the surface activity of pulmonary surfactant." Toxicol Appl Pharmacol 142: 288-96.

Ranford, J. C. and B. Henderson (2002). "Chaperonins in disease: mechanisms, models and treatment." Mol Pathol 55: 209-13.

Repine, J. E., A. Bast, I. Lankhorst (1997). "Oxidative Stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group." Am J Respir Crit Care Med 156: 341-57.

Riabowol, K. T., L. A. Mizzen, W. J. Welch (1988). "Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70." Science 242: 433-36.

Ribeiro, S. P., K. Rhee, L. Tremblay, R. Veldhuizen, J. F. Lewis, A. S. Slutsky (2001). "Heat stress attenuates ventilator-induced lung dysfunction in an ex vivo rat lung model." Am J Respir Crit Care Med 163: 1451-56.

Ribeiro, S. P., J. Villar, G. P. Downey, J. D. Edelson, A. S. Slutsky (1994). "Sodium arsenite induces heat shock protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis." Crit Care Med 22(6): 922-9.

Ribeiro, S. P., J. Villar, G. P. Downey, J. D. Edelson, A. S. Slutsky (1996). "Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF-alpha posttranslational regulation." Am J Respir Crit Care Med 154: 1843-50.

Rinaldo, J. E., M. Gorry, R. Strieter, H. Cowan, R. Abdolrasulnia, V. Shepherd (1990). "Effect of endotoxin-induced cell injury on 70-kD heat shock proteins in bovine lung endothelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol 3(3): 207-16.

Ritossa, F. M. (1962). "A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*." Experientia 18: 571-73.

Romanini, B. M., M. G. Sandri, M. Tosi, M. Mezzetti, A. Mazzetti (1986). "Ambroxol for prophylaxis and treatment of bronchopulmonary complications after chest surgery." Int J Clin Pharmacol Res 6(2): 123-7.

Ryter, S. W. and A. M. K. Choi (2005). "Heme Oxygenase-1: Redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models." Antioxid Redox Signal 7: 80-91.

Saleh, A., S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri (2000). "Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by HSP70." Nat Cell Biol 2: 476-83.

Samali, A., J. Cai, B. Zhivotovsky, D. P. Jones, S. Orrenius (1999). "Presence of a pre-apoptotic complex of procaspase-3, HSP60 and HSP10 in the mitochondrial fraction of Jurat cells." EMBO 18: 2040-48.

Sanders, M. M. and C. Kon (1991). "Glutamine is a powerful effector of heat shock protein expression in *Drosophila* Kc cells." J Cell Physiol 146: 180-90.

Sandström, T. (1995). "Respiratory effects of air pollutants: experimental studies in humans." Eur Respir J 8: 976-95.

Santoro, M. G. (2000). "Heat shock factors and the control of the stress response." Biochem Pharmacol 59(1): 55-63.

Sartori, C. and U. Scherrer (2003). "Turning up the heat in lungs. A key mechanism to preserve their function." Adv Exp Med Biol 543: 263-75.

Schäfer, H. H. (1990). Auswirkungen einer Stickstoffoxid Inhalation auf ausgewählte Komponenten des Surfactant-Systems der Ratte in Abhängigkeit von der Schadstoffdosis und der Expositionsdauer. Marburg, Phillips Universität Marburg.

Schelegle, E. S., A. D. Siefkin, R. J. McDonald (1991). "Time course of ozone-induced neutrophilia in normal humans." Am Rev Respir Dis 143(6): 1353-8.

Seifart, C., U. Clostermann, U. Seifart, B. Müller, C. Vogelmeier, P. von Wiechert, H. Fehrenbach (2005). "Cell-specific modulation of surfactant proteins by ambroxol treatment." Toxicol Appl Pharmacol 203: 27-35.

Sies, H. (1991). "Oxidative Stress: from basic research to clinical application." Am. J. Med 91 Suppl. 3C: 31S-38S.

Simon, M. M., A. Reikerstorfer, A. Schwarz, C. Krone, T. A. Luger, M. Jäättelä, T. Schwarz (1995). "Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release." Clin Invest 95: 926-33.

Skowrya, D., C. Georgopoulos, M. Zylicz (1990). "The E. coli dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner." Cell 62: 939-44.

Soltys, B. J. and R. S. Gupta (1996). "Immunoelectron microscopic localisation of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (HSP60) in mammalian cells." Ex Cell Res 222: 16-27.

Spektor, D. M., M. Lippmann, G. D. Thurston, P. J. Liroy, J. Stecko, G. O'Connor, E. Garshick, F. E. Speizer, C. Hayes (1988). "Effects of ambient ozone on respiratory function in healthy adults exercising outdoors." Am Rev Respir Dis 138(4): 821-8.

Stockstill, B. L., L. Y. Chang, M. G. Menache, P. W. Mellik, R. R. Mercer, J. D. Crapo (1995). "Bronchiolarized metaplasia and interstitial fibrosis in rat lungs chronically exposed to high ambient levels of ozone." Toxicol Appl Pharmacol 134(2): 251-63.

Su, W. Y. and T. Gordon (1997). "In vivo exposure to ozone produces an increase in a 72-kDa heat shock protein in guinea pigs." J Appl Physiol 83(3): 707-11.

Sun, W., R. Wu, J. A. Last (1994). "Coordinated expression of a 45 kD protein and ozone toxicity in a human bronchial epithelial cell line." Am J Respir Cell Mol Biol 10(6): 673-82.

Takahashi, Y., S. Takahashi, T. Yoshimi, T. Miura, K. Mochitate, T. Kobayashi (1997). "Increases in the mRNA levels of gamma-glutamyltransferase and heme oxygenase-1 in the rat lung after ozone exposure." Biochem Pharmacol 53(7): 1061-4.

Thurston, G. D., K. Ito, P. L. Kinney, M. Lippmann (1992). "A multi-year study of air pollution and respiratory hospital admissions in three New York State metropolitan areas: results for 1988 and 1989 summers." J Expo Anal Environ Epidemiol 2(4): 429-50.

Toward, T. J. and K. J. Broadley (2002). "Air function, oedema, cell infiltration and nitric oxide generation in conscious ozone-exposed guinea pigs; effects of dexamethasone and rolipram." Br J Pharmacol 136: 735-45.

Uysal, N. and R. M. Schapira (2003). "Effects of ozone on lung function and lung disease." Curr Opin Pulm Med. 9(2): 144-50.

Vignola, A. M., P. Chanez, B. S. Polla, P. Vic, P. Godard, J. Bousquet (1995). "Increased expression of heat shock protein 70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis." Am J Respir Cell Mol Biol 13: 683-91.

Villar, J., J. D. Edelson, M. Post, J. B. Mullen, A. S. Slutsky (1993). "Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury." Am Rev Respir Dis 147(1): 177-81.

Villar, J. and S. Mendez-Alvarez (2003). "Heat shock proteins and ventilator-induced lung injury." Curr Opin Crit Care 9(1): 9-14.

Villar, J., S. P. Ribeiro, J. B. Mullen, M. Kuliszewski, M. Post, A. S. Slutsky (1994). "Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model." Crit Care Med 22(6): 914-21.

von Wichert, P., U. Bavendamm, M. von Teichmann, G. Müller, E. Thalheim, A. Wilke, Wieggers (1977). "Increased incorporation of fatty acids into phospholipids of lungs and livers of rabbits under the influence of bromhexine and ambroxol." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 26: 269-73.

Voos, W. and K. Rottgers (2002). "Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis." Biochem Biophys Acta 1592: 51-62.

Wang, Y., A. A. Knowlton, T. G. Christensen, T. Shih, S. C. Borkan (1999). "Prior heat stress inhibits apoptosis in adenosine triphosphat-depleted renal tubular cells." Kidney International 55: 2224-35.

Wang, Y. R., X. Z. Xiao, S. N. Huang, F. J. Luo, J. L. You, H. Luo, Z. Y. Luo (1996). "Heat shock pretreatment prevents hydrogen peroxide injury of pulmonary endothelial cells and macrophages in culture." Shock 6(2): 134-41.

Wauer, R. R., G. Schmalisch, H. Hammer, S. Buttenberg, H. Weigel, M. Huth (1989). "Ambroxol for prevention and treatment of hyaline membrane disease." Eur Respir J Suppl 3: 57S-65S.

Weiss, T., P. Dorow, R. Felix (1981). "[Regional mucociliary clearance in patients with small-airways disease (author's transl)]." Prax Klin Pneumol 35(7): 327-30.

Weiss, Y. G., A. Maloyan, J. Tazelaar, N. Raj, C. S. Deutschman (2002). "Adenoviral transfer of HSP-70 into pulmonary epithelium ameliorates experimental acute respiratory distress syndrome." J Clin Invest 110: 801-6.

Weller, B. L., J. D. Crapo, J. Slot, G. Posthuma, C. G. Plopper, K. E. Pinkerton (1997). "Site- and cell-specific alteration of lung copper/zinc and manganese superoxide dismutases by chronic ozone exposure." Am J Respir Cell Mol Biol 17(5): 552-60.

Whittemore, A. S. and E. L. Korn (1980). "Asthma and air pollution in the Los Angeles area." Am J Public Health 70(7): 687-96.

WHO (2000). Guidelines for Air Quality. Geneva, WHO: 47.

Winsel, K. (1992). "[The antioxidative and inflammation inhibiting properties of ambroxol]." Pneumologie 46(9): 461-75.

Wirth, D., E. Christians, C. Munaut, C. Dessy, J Foidart, P. Gustin (2002). "Differential heat shock gene hsp 70-1 response to toxicants revealed by in vivo study of lungs in transgenic mice." Cell Stress Chaperones 7: 387-95.

Wischmeyer, P. E. (2002). "Glutamine and heat shock protein expression." Nutrition 18(3): 225-8.

Wischmeyer, P. E., M. Kahana, R. Wolfson, H: Ren, M. M. Musch, E. B. Chang (2001). "Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat." J Appl Physiol 90: 2403-10.

Wong, C. G., M. Bonakdar, W. J. Mautz, M. T. Kleinmann (1996). "Chronic inhalation exposure to ozone and nitric acid elevates stress-inducible heat shock protein 70 in the rat lung." Toxicology 107(2): 111-9.

Wong, H. R., R. J. Mannix, J. M. Rusnak, A. Boota, H. Zar, S. C. Watkins, J. S. Lazo, B. R. Pitt (1996). "The heat-shock response attenuates lipopolysaccharide-mediated apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol 15(6): 745-51.

Wong, H. R., I. Y. Menendez, M. A. Ryan, A. G. Denenberg, J. R. Wispe (1998). "Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 275: L836-41.

Wong, H. R., M. Ryan, I. Y. Menendez, A. Denenberg, J. R. Wispe (1997). "Heat shock protein induction protects human respiratory epithelium against nitric oxide-mediated cytotoxicity." Shock 8(3): 213-8.

Wong, H. R. and J. R. Wispe (1997). "The stress response and the lung." Am J Physiol 273: L1-9.

Wu, R., Y. H. Zhao, C. G. Plopper, M. M. Chang, K. Chimiel, J. J. Cross, A. Weir, J. A. Last, B. Tarkington (1999). "Differential expression of stress proteins in nonhuman primate lung and conducting airway after ozone exposure." Am J Physiol 277(3 Pt 1): L511-22.

Xu, D. Z., Q. Lu, G. M. Swank, E. A. Deitch (1996). "Effect of heat shock and endotoxin stress on enterocyte viability apoptosis and function varies based on whether the cells are exposed to heat shock or endotoxin first." Arch Surg 131: 1222-28.

Zimmermann, R. G. and G. Weber (1991). Inhibition of lipid peroxygenation by bromohexine, ambroxol and N-acetyl-cysteine, Doc. No.: U961-0608edn. Biberach ab der Riss, Dr. K. Thomae GmbH.

## 6.2 Geräte

Gerät	Firma	Stadt	Land
Ozongenerator	Dr. Hänsler GmbH	Iffezheim	Deutschland
Photometer	Astexs Sorbios	Berlin	Deutschland
Microlance 3 Kanülen (0,45mm)	Becton Dickinson	Drogheda	Irland
Gene Quant 2 RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech	Cambridge	England
Eppendorf Biopur Cups, RNase frei	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Mighty Small 2 Elektrophoresekammer	Hofer Scientific Instruments	San Francisco	USA
Multiphor 2 Graphitplatten	Amersham Pharmacia Biotech	Uppsala	Schweden
Immobilon-P Transfer Membranes	Millipore Co.	Bedford	USA
Electrode Paper Novablot	Amersham Pharmacia Biotech	Uppsala	Schweden
Easy Cast Electrophoresis System B2	Owle Scientific	Woburn	USA
Cell-Tork	SCA Hygiene Paper	Stockholm	Schweden
Gel-Blotting-Papier	Schleicher + Schuell	Dassel	Deutschland
Nylon Membrane pos. Geladen	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim	Deutschland
UV-Stratalinker 1800	Stratagene	La Jolla	USA
Hybridisierungssofen (?)	Heraeus Instruments	Düsseldorf	Deutschland
Einmal-Filterhalter 0,45µm	Schleicher + Schuell	Dassel	Deutschland
Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia Biotech	Uppsala	Schweden

## 6.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie oder Reagenz	Firma	Stadt	Land
Ambroxol (Mucosolvan®)	Boehringer Ingelheim	Ingelheim	Deutschland
Phenobarbital-Natrium (Narcoren®)	Merial GmbH	Halbergmos	Deutschland
Harnstoffpuffer 54%	BioRad, Hercules	Californien	USA
BCA Protein Assay Kit	Pierce	Rockford	USA
Trizol®-Reagent	Gibco BRL	Karlsruhe	Deutschland
Aqua ad iniectabilia Braun	Braun	Melsungen	Deutschland
Oligo (dT) (12-18) Primer	Live Technologies	Paisley	England
dNTP-Mix, 10mM	Fermentas	Burlington	Kanada
5*RT-Puffer	Gibco BRL	Karlsruhe	Deutschland
0,1M DTT	Invitrogen	Carlsbad	USA
Reverse Transkriptase (200U/µl)	Gibco BRL	Karlsruhe	Deutschland

Rotiphorese 30	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	Deutschland
TEMED	Sigma	St. Louis	USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva	Heidelberg	Deutschland
TRIS (Trisbase)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	Deutschland
EDTA	Sigma	St. Louis	USA
SDS	Böhringer Mannheim	Indianapolis	USA
Tris-hydrochlorid	Böhringer Mannheim	Indianapolis	USA
Glycerin, wasserfrei	Merck	Darmstadt	Deutschland
Bromphenolblau-Na-Salz	Serva	Heidelberg	Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma	St. Louis	USA
MultiMark Multi Colored Standard	Invitrogen Carlsbad	Carlsbad	USA
Borsäure	Riedel-de Haen	Seelze	Deutschland
Methanol	Riedel-de Haen	Seelze	Deutschland
BSA (Albumin bovine, Fraktion 5)	Serva	Heidelberg	Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Merck	Darmstadt	Deutschland
Essigsäure (min.99,8%)	Riedel-de Haen	Seelze	Deutschland
Antikörper Western			
Maus-Immunoglobuline	DAKO	Glostrup	Dänemark
Kaninchen-Immunoglobuline	DAKO	Glostrup	Dänemark
BCIP/NBT Alkaline Phosphatase Substrate	SIGMA	St. Louis	USA
PCR-Puffer (10*)	Böhringer Mannheim	Indianapolis	USA
PCR-Nukleotidmix 10mM	Böhringer Mannheim	Indianapolis	USA
GAPDH-Primer 3'			
GAPDH-Primer 5'			
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	Roche	Mannheim	Deutschland
Ethidium Bromide Solution	Live Technologies	Paisley	England
PCR-Primer HSP Ratte sense/antisense	MWG-Biotech GmbH	Ebersberg	Deutschland
Agarose	Live Technologies	Paisley	England
MOPS	Böhringer Mannheim	Indianapolis	USA
Natriumacetat	Merck	Darmstadt	Deutschland
Formaldehyd min.37%	Merck	Darmstadt	Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck	Darmstadt	Deutschland
Bromphenol Blau	Sigma	St. Louis	USA
Formamid	Merck	Darmstadt	Deutschland

SSC-Puffer (20*)	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim	Deutschland
Blocking-Reagenz	Böhringer Mannheim	Indianapolis	USA
N-Laurylsarcosin	Sigma	St. Louis	USA
Maleinsäure	Sigma	St. Louis	USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck	Darmstadt	Deutschland
Anti-Digoxigenin-AP	Böhringer Mannheim	Indianapolis	USA
Tween 20	Sigma	St. Louis	USA
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Baker B.V.	Deventer	Holland
CDP-Star	Tropix	Bedford	USA

## 6.4 Übersichtstabellen

a) Ergebnisse mit Standardabweichungen und Signifikanzen ( $p$  entspricht  $p_K$ , d.h. der Signifikanz der HSP Expression nach Ozon in Bezug auf die Kontrollen)

HSP 32		8h 1,5ppm	8h 1,5ppm+A	8h 3ppm	8h 3ppm+A	8h A	12h 0,6ppm	12h 0,6ppm+A	12h A	24h 0,6ppm	24h 0,6ppm+A	24h A
Western Blot:	MW in %	360	339,5	436,5	119,75	131,75	683	545,25	208,5	989,25	830,5	155,5
	STABW in %	13,66	154,03	28,07	12,58	34,99	124,18	156,42	46,38	164,74	165,18	18,95
	Signifikanz	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,0233$ sign.	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,0226$ sign.	$p = 0,0929$ n.s.	$p = 0,0003$ hoch sign.	$p = 0,0024$ hoch sign.	$p = 0,0054$ hoch sign.	$p = 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,0003$ hoch sign.	$p = 0,0021$ hoch sign.
PCR:	MW in %	626,42	445,86	536,16	672,24	145,10	267,20	236,06	88,93	121,16	93,46	118,80
	STABW in %	20,11	111,53	10,35	114,37	52,16	13,00	62,84	36,47	31,34	26,79	8,41
	Signifikanz	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,0858$ n.s.	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,0006$ hoch sign.	$p = 0,2934$ n.s.	$p = 0,1787$ n.s.	$p = 0,3216$ n.s.	$p = 0,1658$ n.s.

HSP 70		8h 1,5ppm	8h 1,5ppm+A	8h 3ppm	8h 3ppm+A	8h A	12h 0,6ppm	12h 0,6ppm+A	12h A	24h 0,6ppm	24h 0,6ppm+A	24h A
Western Blot:	MW in %	40,67	57,67	10,67	46,47	82,34	53,34	69	77,34	83	79,67	85
	STABW in %	19,14	18,61	5,51	11,15	16,80	2,08	10,58	11,06	15,59	13,61	13,89
	Signifikanz	$p = 0,0029$ hoch sign.	$p = 0,0085$ hoch sign.	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,0006$ hoch sign.	$p = 0,0713$ n.s.	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,0036$ hoch sign.	$p = 0,0119$ sign.	$p = 0,0660$ n.s.	$p = 0,0304$ sign.	$p = 0,0674$ n.s.
PCR:	MW in %	249,76	241,10	247,82	360,00	65,88	163,44	197,62	66,09	106,14	116,84	124,89
	STABW in %	36,07	100,62	23,94	30,53	15,45	17,51	45,30	22,26	18,43	19,05	10,68
	Signifikanz	$p = 0,0084$ hoch sign.	$p = 0,0163$ sign.	$p = 0,0006$ hoch sign.	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,0017$ hoch sign.	$p = 0,0027$ hoch sign.	$p = 0,0020$ hoch sign.	$p = 0,0188$ sign.	$p = 0,3774$ n.s.	$p = 0,0829$ n.s.	$p = 0,0598$ n.s.

HSC 70		8h 1,5ppm	8h 1,5ppm+A	8h 3ppm	8h 3ppm+A	8h A	12h 0,6ppm	12h 0,6ppm+A	12h A	24h 0,6ppm	24h 0,6ppm+A	24h A
Western Blot:	MW in %	61,67	63,34	9,34	61,34	100	55,34	60	95	97	95	96,67
	STABW in %	3,79	20,21	3,51	7,77	9,17	15,04	10,00	9,17	8,89	11,27	3,51
	Signifikanz	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,0174$ sign.	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,0005$ hoch sign.	$p = 0,5000$ n.s.	$p = 0,0034$ hoch sign.	$p = 0,0011$ hoch sign.	$p = 0,1991$ n.s.	$p = 0,2951$ n.s.	$p = 0,2425$ n.s.	$p = 0,0878$ n.s.
PCR:	MW in %	135,83	135,93	110,69	128,37	84,17	95,59	72,69	103,87	34,70	26,14	67,50
	STABW in %	25,36	31,81	14,71	10,36	17,69	26,83	24,36	22,67	38,89	9,66	15,45
	Signifikanz	$p = 0,0489$ sign.	$p = 0,0422$ sign.	$p = 0,1770$ n.s.	$p = 0,0013$ hoch sign.	$p = 0,0791$ n.s.	$p = 0,3870$ n.s.	$p = 0,0432$ sign.	$p = 0,3779$ n.s.	$p = 0,0002$ hoch sign.	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,0303$ sign.

HSP 60		8h 1,5ppm	8h 1,5ppm+A	8h 3ppm	8h 3ppm+A	8h A	12h 0,6ppm	12h 0,6ppm+A	12h A	24h 0,6ppm	24h 0,6ppm+A	24h A
Western Blot:	MW in %	66,3	39,27	40,19	75,88	92,56	76,27	68,47	89,14	77	72,17	69,2
	STABW in %	15,31	23,81	15,32	25,78	7,99	4,12	11,73	9,04	8,03	12,79	2,43
	Signifikanz	$p = 0,0094$ hoch sign.	$p = 0,0058$ hoch sign.	$p = 0,0012$ hoch sign.	$p = 0,0902$ n.s.	$p = 0,0912$ n.s.	$p = 0,0003$ hoch sign.	$p = 0,0048$ hoch sign.	$p = 0,0529$ n.s.	$p = 0,0038$ hoch sign.	$p = 0,0098$ hoch sign.	$p < 0,0001$ hoch sign.
PCR:	MW in %	79,34	88,80	108,07	87,96	137,18	88,93	86,61	75,92	56,33	40,51	100,92
	STABW in %	11,97	22,05	19,03	10,88	28,83	9,21	17,84	11,92	40,66	10,87	13,14
	Signifikanz	$p = 0,0028$ hoch sign.	$p = 0,2060$ n.s.	$p = 0,3066$ n.s.	$p = 0,0532$ n.s.	$p = 0,0266$ sign.	$p = 0,0220$ sign.	$p = 0,1167$ n.s.	$p = 0,0015$ hoch sign.	$p = 0,0061$ hoch sign.	$p < 0,0001$ hoch sign.	$p = 0,4614$ n.s.

b) Auswirkung von Ambroxol ( $p$  entspricht  $p_A$ , d.h. der Signifikanz der HSP Expression nach Ozon in Bezug auf alleinige Ozonexposition)

HSP 32	8h 1,5ppm	8h 3ppm	12h 0,6ppm	24h 0,6ppm
Western Blot	$p=0,3999$	$p<0,0001$	$p=0,1085$	$p=0,1112$
	n.s.	↓hoch sign.	n.s.	n.s.
PCR	$p=0,0291$	$p=0,0194$	$p=0,1593$	$p=0,0674$
	sign.	↑sign.	n.s.	n.s.

HSP 70	8h 1,5ppm	8h 3ppm	12h 0,6ppm	24h 0,6ppm
Western Blot	$p=0,1660$	$p=0,0037$	$p=0,0348$	$p=0,3971$
	n.s.	↑hoch sign.	↑sign.	n.s.
PCR	$p=0,4758$	$p=0,0014$	$p=0,0755$	$p=0,1639$
	n.s.	↑hoch sign.	n.s.	n.s.

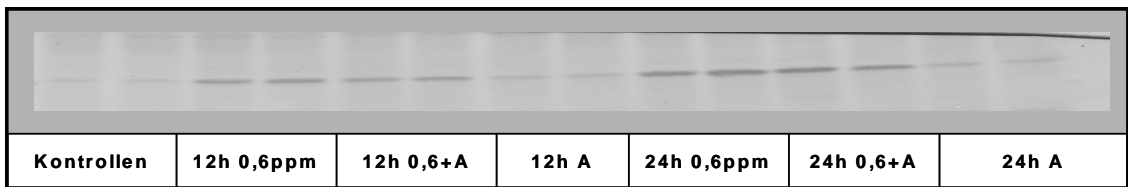
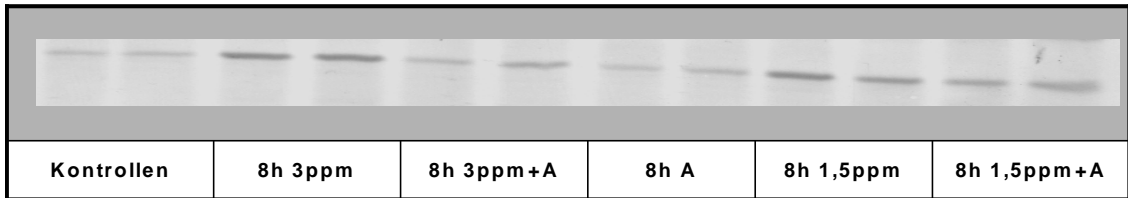
HSC 70	8h 1,5ppm	8h 3ppm	12h 0,6ppm	24h 0,6ppm
Western Blot	$p=0,4476$	$p=0,0002$	$0,3389$	$p=0,4106$
	n.s.	↑hoch sign.	n.s.	n.s.
PCR	$p=0,4977$	$p=0,0280$	$p=0,0576$	$p=0,0892$
	n.s.	↑sign.	n.s.	n.s.

HSP 60	8h 1,5ppm	8h 3ppm	12h 0,6ppm	24h 0,6ppm
Western Blot	$p=0,0867$	$p=0,0541$	$p=0,1962$	$p=0,3056$
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PCR	$p=0,1910$	$p=0,0334$	$p=0,3945$	$p=0,0434$
	n.s.	↓sign.	n.s.	↓sign.

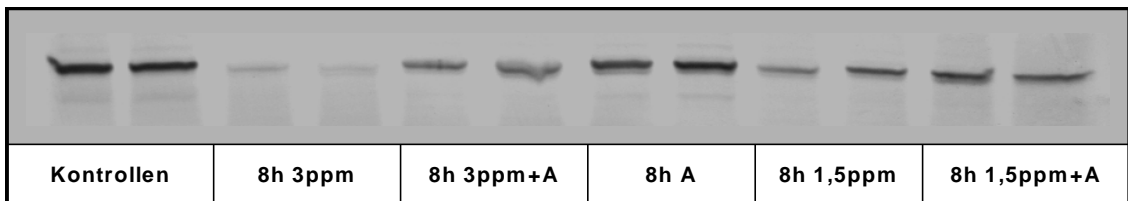
6.5 Ausgewählte Original Blots

6.5.1 Western Blot

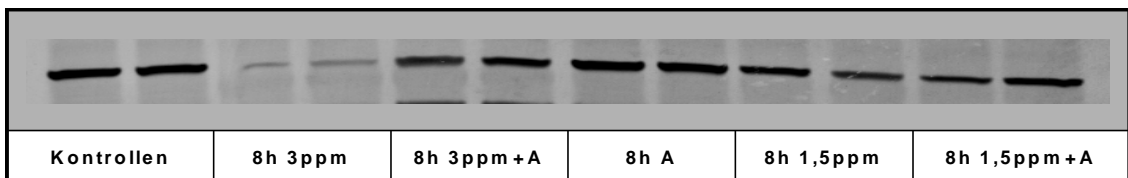
a) HSP 32



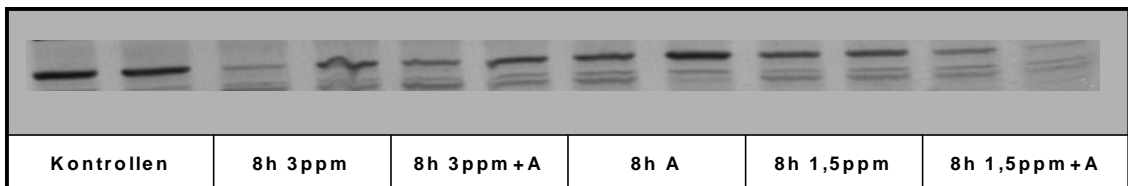
b) HSP 70



c) HSC 70

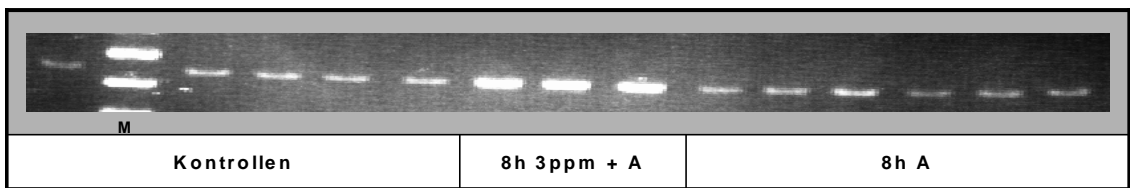
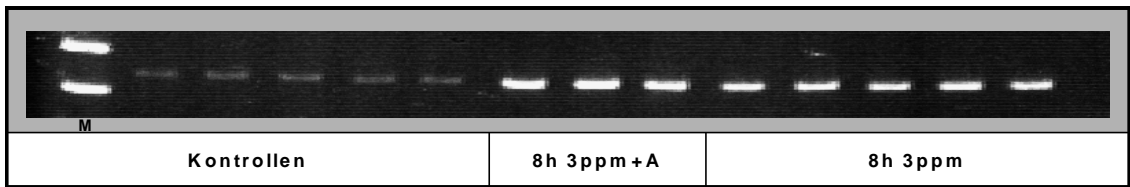
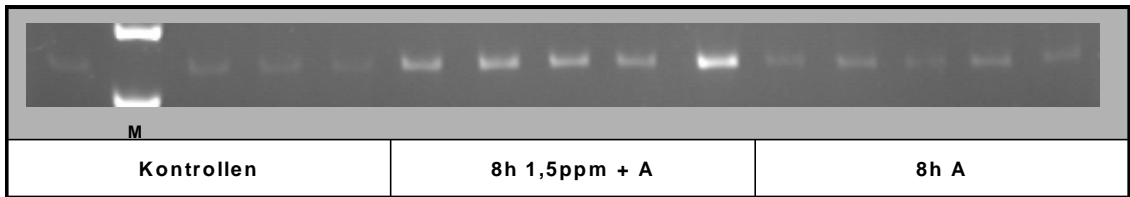
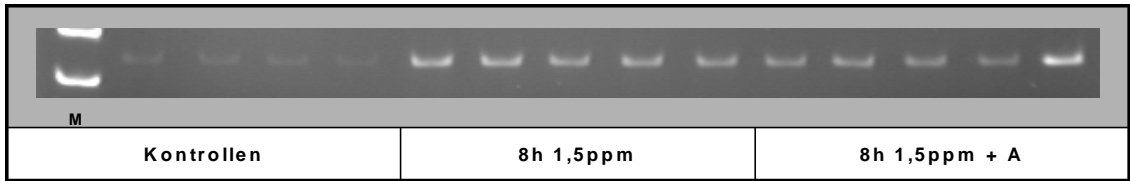


d) HSP 60

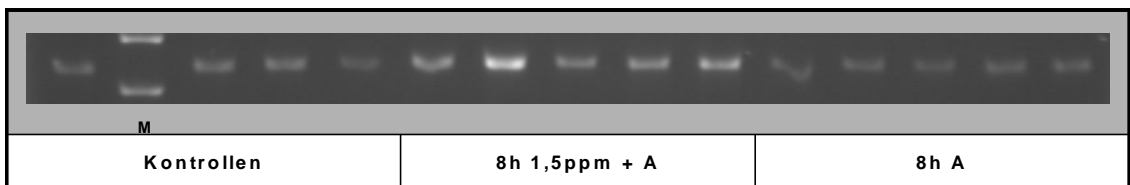
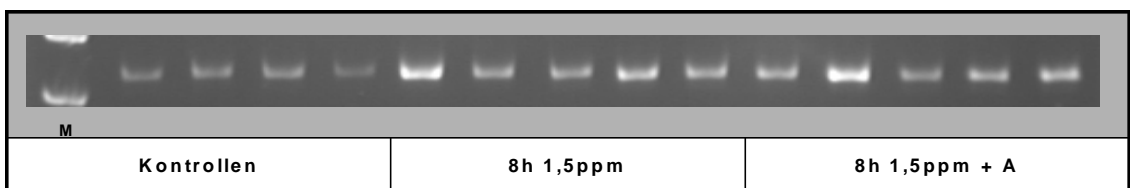


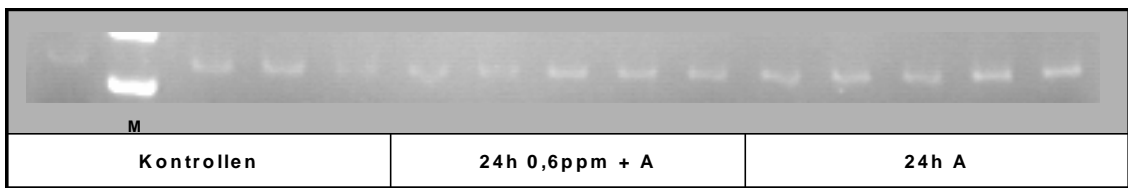
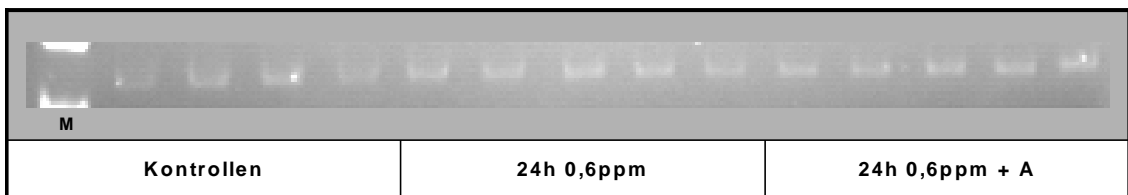
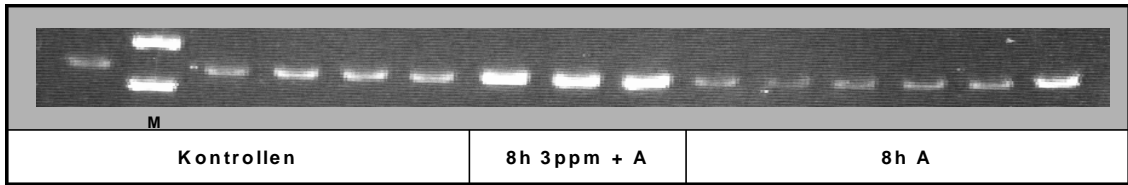
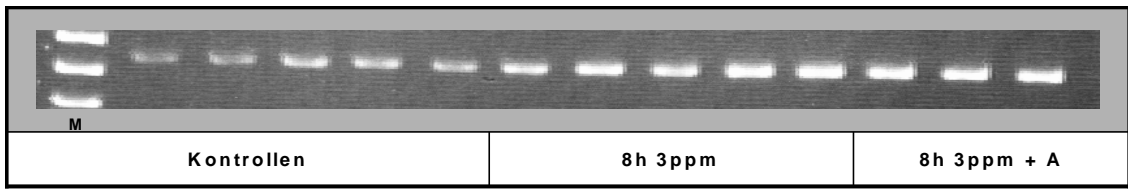
6.5.2 PCR

a) HSP 32

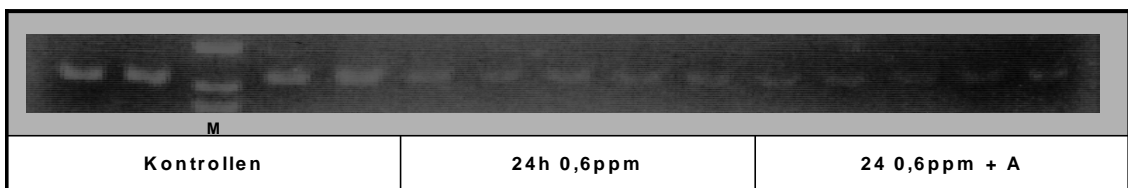
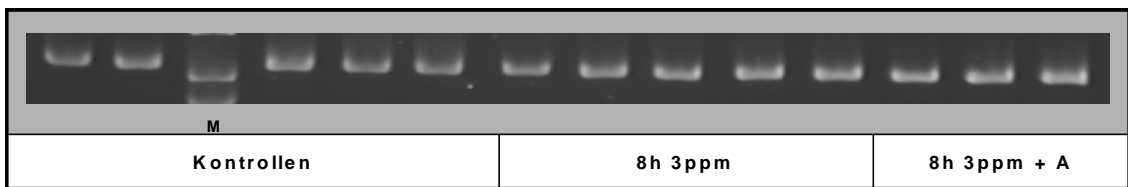
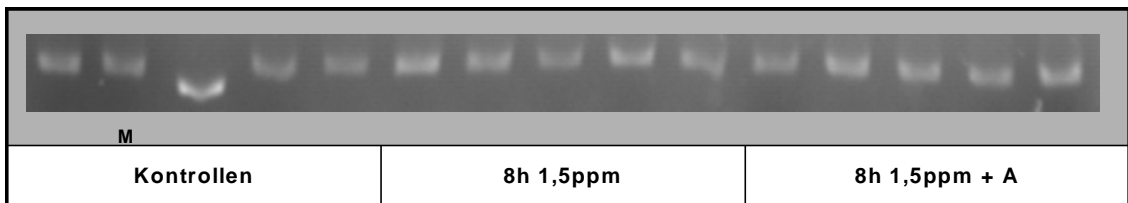


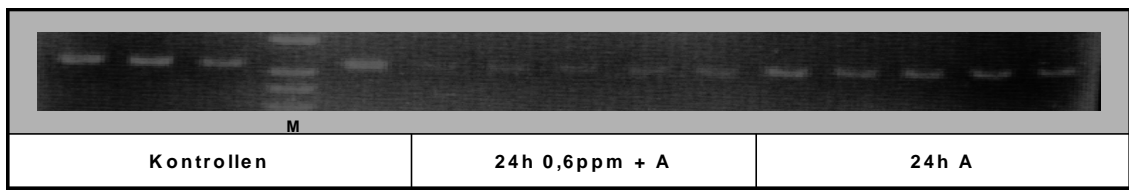
b) HSP 70



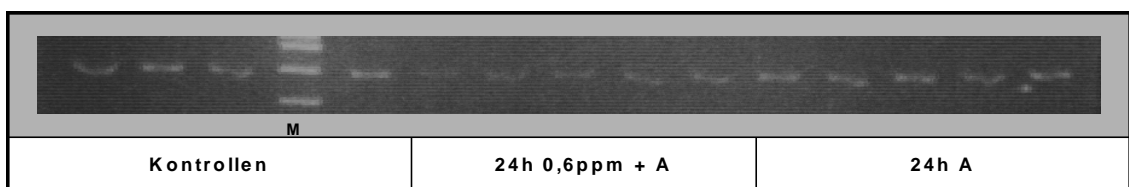
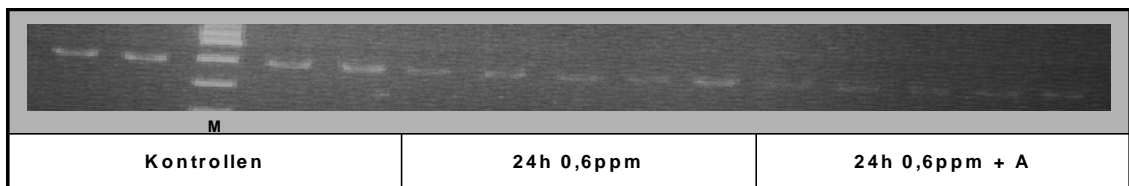
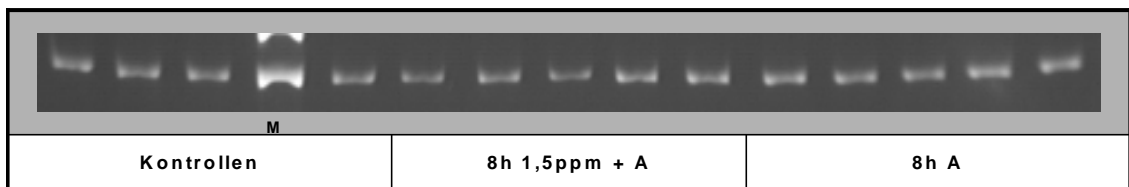
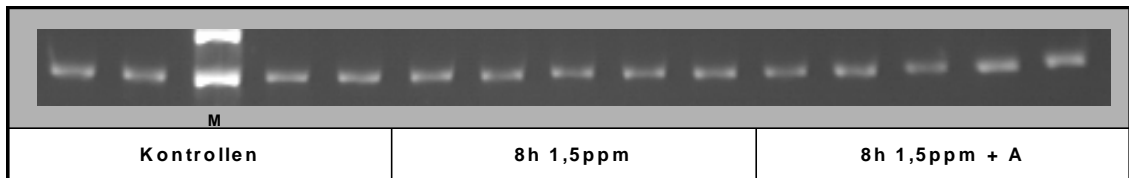


c) HSC 70





d) HSP 60



## 6.6 Tabellarischer Lebenslauf

Mariam Ilse Sachse (geb. Mirtsch)  
Milchstrasse 17  
26123 Oldenburg

### Persönliche Angaben:

Geburtsdatum: 22. März 1977  
Geburtsort: Hamburg  
Eltern: Dr. Schokufeh Mirtsch, geb. Saboorian, Chemikerin  
Prof. Dr. Mirtsch, Hochschullehrer für Physik

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife am 30.05.1996 in Berlin

### Studium:

Sept. 1996	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
15.09.1998	Ärztliche Vorprüfung
31.08.1999	Erster Abschnitt der Ärztliche Prüfung
Sept. 1999	Wechsel zur Phillips-Universität Marburg
April 2001	Beginn der Dissertation in der Klinik für Innere Medizin an der Phillips-Universität Marburg: „Stressantwort in Ozon-induzierten Lungenschäden und deren Modulation durch Ambroxol“
25.03.2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Aug. 02 – Aug. 03	Praktisches Jahr am Nobel's Hospital, Isle of Man, GB (Innere Medizin); Kantonsspital Münsterlingen, Schweiz (Chirurgie); Städtische Kliniken Oldenburg (Dermatologie)
27.10.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,9)

### Tätigkeiten als Assistenzärztin:

Feb. 04 – Jan. 05	Ev. Waldkrankenhaus Spandau, Berlin (Innere Medizin)
Feb. 05 – Aug. 05	Noble's Hospital, Isle of Man, GB (Innere Medizin)
seit Okt. 2005	Ev. Krankenhaus Oldenburg (Innere Medizin)

## 6.7 Verzeichnis der Akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Marburg:

Arnold; Aumüller; Barth; Baum; Beato; Bertalanaffy, Bien; Bolm; Cetin; Christiansen; Czubayko; Daut; Feuser; Fruhstorfer; Gemsa; Geus; Gotzen; Gressner; Griss; Gröne; Grzeschnik; Habermehl; Happle; Hasilik; Hellinger; Hesse; Hofmann; Joseph; Kern; Kleine; Klenk; Klose; Koch; Koolmann; Kretschmer; Krieg; Kroll; Kuhn; Lang; Lange; Lennartz; Maisch; Moll; Moosdorf, Mueller; Oertel; Rehder; Remschmidt; Röhm; Rothmund; Schachtschabel; Schäfer; Schüffel; Schulz; Schulze; Scharz; Seifart; Seitz; Seyberth; Slenczka; Steininger; Sturm; Vohland; Voigt; v. Wichert; Weihe; Werner; Westermann; Wilhelm

in Lübeck:

Bäumli; Busch; Dominiak; Eder; Eggers; v. Engelhardt; Fehm; Feller; Gross; Hartmann; Helmberger; Hilgenfeld; Ingensiep; Jelkmann; Kessel; Klinger; Knobloch; Krüger; Kunze; Merz; Pagel; Paulsen; Peters; Petersen; Schmielau; Schmucker; Solbach; Stengel; Weimar; Weiss; Westermann; Winking

## 6.8 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. C. Seifart und Herrn Prof. Dr. P. von Wichert für das Überlassen des Themas, die intensive Betreuung und die freundliche Unterstützung in allen Belangen.

Ich möchte mich auch herzlich bei Frau Dr. U. Clostermann für die hervorragende praktische Anleitung und die Beantwortung der zahllosen Fragen bedanken. Mein Dank gilt auch Frau E. Beato für die vielen Hilfestellungen und Tipps.

Meinen lieben Eltern danke ich herzlichst, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht haben und bei meinem bisherigen Weg immer unterstützend und ermutigend hinter mir standen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Max, der mir jeden Tag wieder zeigt, dass es sich lohnt, an seine Träume und Ziele zu glauben. Ihm und meinen Eltern ist diese Arbeit gewidmet.



