

AUS DEM ZENTRUM FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN DER UNIVERSITÄT  
ZU KÖLN

KLINIK UND POLIKLINIK FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN  
DIREKTOR: UNIVERSITÄTSPROFESSOR DR. MED. J. DÖTSCH

# **Die Rolle von Interleukin-6 in der sauerstoffinduzierten Schädigung des Hippocampus in der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE DER  
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT ZU KÖLN

vorgelegt von  
Fabienne Korcz  
aus Eitorf Deutschland

promoviert am 19. Juni 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Druckjahr 2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. W. Dötsch

2. Gutachterin: Professorin Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Rüger

**Erklärung:**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. J. Dötsch und Frau Dr. Dr. nat. med. E. Hucklenbruch-Rother erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden molekularbiologischen und biochemischen Experimente, sowie die Färbung und Durchführung der Assays, sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Christina Vohlen von mir selbstständig durchgeführt und ausgewertet worden. Die Durchführung der Hyperoxie-Versuche bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen und die Entnahme der Hippocampi der Versuchstiere wurden von Mitarbeitern der AG von Jun. Prof. Dr. Dr. nat. med. Miguel A. Alejandre Alcazar in der Universitätsklinik zu Köln durchgeführt. Die Zellkulturen wurden von Prof. Dr. Alex Methner aus der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Zellkulturversuche wurden wiederum von mir durchgeführt

**Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:**

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 12.02.2023

Unterschrift:



## **Danksagung:**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich bei der Anfertigung der Doktorarbeit fachlich und motivierend unterstützt haben.

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Jörg Dötsch. Vielen Dank für die Möglichkeit meine Dissertation in einer Ihrer Arbeitsgruppen anzufertigen. Zudem möchte ich mich bei Ihnen für das Überlassen dieses interessanten Dissertationsthemas, sowie die Betreuung meiner Dissertation bedanken.

Mein nächster herzlicher Dank geht an Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother. Herzlichen Dank für die Betreuung während meiner Dissertation, deine stets geduldigen Hilfestellungen und deine unaufhörliche Unterstützung. Ohne deine freundliche Art und Hilfe hätte ich es nicht geschafft.

Außerdem geht mein herzlicher Dank an Frau Christina Vohlen . Vielen Dank für deine Unterstützung und geduldige Anleitung bei der Durchführung der Experimente. Du wusstest immer was zu tun ist, wenn ein Versuch mal nicht so funktionieren wollte, wie er sollte. Die Zusammenarbeit mit dir hat immer viel Spaß gemacht.

Vielen Dank an Jun. Prof. Dr. Dr. nat. med. Miguel A. Alcazar und die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für experimentelle Pneumologie - Translationale Experimentelle Pädiatrie für die Durchführung der Hyperoxie-Versuche und das Bereitstellen der Hippocampi der Versuchstiere.

Vielen Dank an Prof. Dr. Alex Methner und seine Mitarbeiter für das Bereitstellen der HT-22-Zellen.

Vielen Dank an Dr. rer. nat. Ruth Janoschek, Dr. Inga Bae-Gartz, Dr. Lisa Schmitz, Rebecca Kuglin, Marion Handwerk, Dr. rer. nat. Sarah Appel und Maria Wohlfarth für die freundliche und lustige Arbeitsatmosphäre, sowie sämtliche Hilfestellungen.

Danke auch an alle aktuelle und ehemalige Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für Translationale Neonatologie sowie für Metabolismus und perinatale Programmierung.

Mein finaler Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und Markus. Danke für eure Unterstützung während meines Studiums und der Dissertation. Ohne eure Motivation wäre all das nicht möglich gewesen! Danke!

*Für meine Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>11</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>12</b>
2.1 Hyperoxie als Therapiemöglichkeit	12
2.2 Auswirkungen der Hyperoxie auf die Lunge	13
2.3 Auswirkungen der Hyperoxie auf das Gehirn	14
2.4 Der Hippocampus	15
2.5 HT22-Neuronen	16
2.6 Inflammation, IL6-Zytokinwirkung, Gliose	17
2.7 Wachstumssignalwege	23
2.8 Apoptose	25
2.9 Plastizität	26
2.10 Stand der Forschung	27
2.11 Arbeitshypothese und Fragestellung	28
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>30</b>
3.1 Tierversuch Methoden	30
3.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	30
3.1.2 Versuchsaufbau	30
3.2 Zellkultur-Methoden	31
3.2.1 Zellen und Haltungsbedingungen	31
3.2.2 Versuchsaufbau	31
3.2.3 Ernten der Zellen	32
3.3 Geräte und Materialien	33
3.3.1 Hard- und Software	33
3.3.2 Material Molekularbiologische Methoden	34
3.3.3 Material Proteinbiochemische Methoden	35
3.3.4 Material Zellkultur	36
3.3.5 Material Histologie	37
3.3.6 Puffer, Stammlösungen und Chemikalien	38
3.3.7 Oligonukleotide	40
3.3.8 Antikörper	42
3.4 Molekularbiologische Methoden	43
3.4.1 RNA-Isolation	43
3.4.2 Umschreiben in cDNA	43
3.4.3 Grundlagen Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)	44
3.4.4 TaqMan real-time PCR	45
3.4.5 SYBR-Green real-time PCR	45
3.4.6 Unterschiede bei den Zellkultur-Versuchen	45

3.5	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	46
3.5.1	Protein-Isolation . . . . .	46
3.5.2	Protein-Konzentrationsbestimmung . . . . .	46
3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	48
3.5.4	Unterschiede bei den Zellkultur-Versuchen . . . . .	49
3.6	Zellkultur Färbung . . . . .	50
3.7	Assays . . . . .	51
3.7.1	MTT-Assay . . . . .	51
3.7.2	Caspase-Assay . . . . .	51
3.7.3	Neurite Outgrowth-Assay . . . . .	51
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
4.1	Inflammation/ IL6-Zytokinwirkung/ Gliose . . . . .	54
4.2	Wachstum und Signalwege . . . . .	63
4.3	Apoptose . . . . .	73
4.4	Plastizität . . . . .	75
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
5.1	Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Inflammation, IL-6-Zytokinwirkung und Gliose	82
5.2	Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Wachstumssignalwege . . . . .	86
5.3	Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Apoptose . . . . .	91
5.4	Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Plastizität . . . . .	92
5.5	Vergleich der aktuellen Ergebnisse mit den Vordaten . . . . .	95
5.6	Kritikpunkt Mausarten . . . . .	97
5.7	Kritikpunkt IL-6-Knockout . . . . .	98
5.8	Ausblick . . . . .	99
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>108</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Wenn ich im Folgenden von Sauerstoff spreche, so meine ich, wenn es nicht anders spezifiziert wird, Luft mit einem Sauerstoffanteil von mehr als 21 %. Somit enthält diese Luft dann mehr Sauerstoff, als in unserer normalen Atemluft vorhanden ist und es entsteht der Zustand einer Hyperoxie.

°C - Grad Celsius

µg - Mikrogramm

µl - Mikroliter

µM - Mikromol

3' - 3' Ende der DNA-Sequenz

5' - 5' Ende der DNA-Sequenz

Aqua dest. - Aqua destillata (destilliertes Wasser)

ADAM - A Disintegrin And Metalloproteinase

Akt- Proteinkinase B

Bax - Bcl2-alike Protein 4

BCL2 oder Bcl 2 - B-Cell-Lymphoma-Protein 2

BDNF - Brain-Derived Neurotrophic Factor

BSA - Bovines Serumalbumin

B-Zellen - B-Lymphozyten

bzw. - beziehungsweise

CAMKII - Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II

cAMP - Cyclic Adenosine Monophosphat

Casp3 - Caspase-3

CD4 - T- Helferzellen - T-Helferzellen oder CD4-Lymphozyten

cDNA - complementary DNA

cfos - Protein c-Fos

Cm - Zentimeter

CNTF - Ciliary Neurotrophic Factor

CO - Kontrolle

Ct - Cycle threshold

CTGF - Connective tissue growth factor

Cy3 - Cyanine 3

DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol

dNTP- Desoxynukleosidtriphosphat

DEPC - Diethylpyrocarbonat

DNA - Deoxyribonucleic acid

dt-Primer - Oligoprimer

ECL - Enhanced Chemiluminescence

EDTA - Ethylendiamintetraessigsäure

et al. - et alii, et aliae, et alia - und andere

Erk - Extracellular-signal Regulated Kinases

FRET - Fluorescence resonance energy transfer

G - Gramm

G/l - Gramm pro Liter

GAP 43 - Growth associated Protein 43

GAPDH - Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GDNF - Glial Cell-line Derived Neurotrophic Factor

GFAP - Glial fibrillary acidic protein

GFI-1 - Growth factor independence-1

GTP- Guanosine triphosphate

h- Stunden

HPLC - high performance liquid chromatography

HT22-Neuronen - Immortalisierte Zelllinie aus dem Hippocampus der Maus

HYX - Hyperoxie

Hz - Herz

Iba 1 - Ionized calcium-binding adapter molecule 1

IL1 - Interleukin 1

IL-6 oder IL6 - Interleukin 6

IL6-/- - Interleukin 6 Knockout

IL6-nAK - Interleukin 6 neutralisierender Antikörper

IL-6R - Interleukin 6 Rezeptor

ICAM- Intercellular adhesion molecule

IRAK - Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase

JAK - Januskinase

kDa - Kilodalton

KO - Knockout

L - Liter

l/min - Liter pro Minute

M. - Morbus  
MAPK - Mitogen-activated protein  
mA - Milliampere  
MCP4 - Monocyte Chemoattractant Protein 1  
MEK - Mitogen-activated protein kinase kinase  
Min - Minute  
Mm Millimeter  
mL - Milliliter  
mM - Millimolar  
MMLV - Moloney Murine Leukemia Virus  
MMP - Matrix metalloproteinases  
mRNA - MessengerRNA  
ms - Milisekunden

NaF - Natriumfluorid  
NA3 Vo4 - Natriumorthovanadat  
ng - Nanogramm  
NGF - Nerve Growth Factor  
NOX - Normoxie  
Nr. - Nummer  
NT4/5 - Neurotrophin 4/5

P28 - Tag 28 nach der Geburt  
p21 - cyclin-dependent kinase inhibitor 1  
P75 - NTR P75 Neurotrophin-Rezeptor  
PAK - p21-aktivierte Kinasen  
PBS - Phosphate buffered saline  
PCNA - Proliferating cell nuclear antigen  
PCR - Polymerase Kettenreaktion  
PFA - Perfluoralkoxylalkan  
pH - potential hydrogenii  
PI3K - Phosphoinositid-3-Kinasen  
PMSF - Phenylmethylsulfonylfluorid  
p-Wert - Signifikanzwert  
qPCR - Real-Time PCR

Raf - Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Kinase  
Ras - Rat sarcoma virus GTPase  
RIPA - Radioimmunpräzipitations-Assay  
RNA - Ribonucleic acid  
Rpm - revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)

RSV - Respiratorisches Synzytial-Virus

SEM - Standard Error of Means

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate

Sec - Sekunde

SOCS 1 - Suppressor of cytokine signaling1

SOCS3 - Suppressor of cytokine signaling 3

STAT3 - Signal Transducers and Activators of Transcription 3

TBST - Tris-Buffered Saline-Tween

TGF beta - Transforming Growth Factor beta

TNF - Tumornekrosefaktor

Treg - regulatory T cells

Trk - Tryosinkinase-rezeptor

Tyk2 - Tyrosine kinase 2

T-Zellen - T-Lymphozyten

U - Unit

U/min Umdrehungen pro Minute

UV - Ultraviolettstrahlung

V - Volt

VEGF - Vascular endothelial growth factor

VEGFR - VEGF Rezeptor

WT - Wildtyp

z.B. - zum Beispiel

Zk - Zellkultur

ZNS - Zentrales Nervensystem

# 1 Zusammenfassung

Reiner Sauerstoff ist essentiell bei der Therapie verschiedener Krankheiten bei Patienten jeglichen Alters, auch im Neugeborenenalter, geworden. Im Verlauf der Anwendung der Sauerstofftherapie zeigen sich allerdings auch immer mehr Nebenwirkungen durch die Hyperoxie in verschiedensten Organen und verschiedenen Zellen. Versuche, welche die Auswirkungen von Hyperoxie auf das Gehirn untersuchen, zeigen, dass es durch Hyperoxie zu Hirnreifeverzögerungen und Gedächtnisstörungen kommen kann.

Ein Ziel der durchgeführten Arbeit ist es, die Auswirkungen von Hyperoxie auf den Hippocampus, als Funktionsbestandteil des Gedächtnis und Neuronen des Hippocampus, herauszufinden. Es zeigen sich unter Hyperoxie in den Untersuchungen proinflammatorische Prozesse. In der Lunge konnte bereits eine Verbindung der sauerstoffinduzierten Gewebeschädigung zu Interleukin 6 nachgewiesen werden. Ein weiteres Ziel der durchgeführten Arbeit ist es daher herauszufinden, ob durch eine Blockade von Interleukin 6 schädliche Folgen durch Hyperoxie vermieden werden können.

Hierzu werden die Hippocampi 28 Tage alter Mäuse, welche in Hyperoxie und Normoxie gehalten werden, sowie zwei Gruppen mit Interleukin 6-Knockout-Mäusen, untersucht. Zudem werden HT22-Zellen, welche in Hyperoxie und Normoxie gezüchtet werden, sowie zwei Gruppen mit Interleukin 6-neutralisierendem Antikörper, zum Zeitpunkt von 24h, 48h und 72h, untersucht.

Im Bezug auf Inflammation und Gliose, Wachstumssignalwege, Apoptose und Plastizität zeigen sich folgende Ergebnisse. Bezüglich der Inflammation und Gliose zeigt sich eine zu erwartende überwiegende Induktion der Expression durch Hyperoxie, besonders bei MCP1, TGF beta und CTGF. Durch die Interleukin 6-Blockade zeigt sich keine Veränderung. Bei den Wachstumssignalwegen zeigen sich teils, im Vergleich zu der Literatur, unerwartete Ergebnisse, wie eine erhöhte Expression von PCNA (Zellproliferation und DNA-Replikation) durch Hyperoxie, sowie eine erhöhte Expression von p21 und Doublecortin (Hemmung DNA-Synthese, Induktion Neurogenese). Auf Grund der Interleukin 6-Blockade zeigt sich bei VEGF eine erhöhte Expression bei Hyperoxie, als Zeichen einer Verstärkung des Endothelwachstums. Auch Erk zeigt eine erhöhte Expression bei Hyperoxie und durch den IL6-Knockout, welches für die Induktion von Zellüberleben und -differenzierung durch die IL6-Blockade stehen könnte. Bezüglich der Apoptose zeigt sich kein signifikanter Unterschied durch Hyperoxie oder IL6-Blockade. Im Bereich der Plastizität zeigen sich insbesondere längere Neuronenausläufer und eine Induktion von Synapsin bis 48h, welches für eine initiale Mobilisierung synaptischer Vesikeln sprechen könnte. Durch die Interleukin 6-Blockade zeigt sich eine geringere Expression von CAMKII bei Hyperoxie, welches Auswirkungen auf eine Reduktion des Langzeitlernens haben könnte. Zudem zeigt sich eine vermehrte Synapsin- und GAP43-Expression bei Hyperoxie, welches die neuronale Plastizität, das Axonenwachstum und die Synapsneneuformung begünstigen könnte.

Durch verschiedene Kritikpunkte wie die Verwendung von unterschiedlichen Mausarten (B6N und B6J) und die Effektivität der Interleukin 6-Blockade sind weitere Versuche zur Überprüfung der Daten notwendig. Allgemein zeigen sich in den bisher durchgeführten Versuchen einige Ansatzpunkte für eine medikamentöse Prävention von Schäden durch die Sauerstofftherapie, welche weiter untersucht werden müssen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Hyperoxie als Therapiemöglichkeit

Seit der Möglichkeit der Herstellung reinen Sauerstoffs hat dieser einen hohen Stellenwert in der Medizin gefunden.

Bei verschiedenen Erkrankungen im Erwachsenen- sowie im Kindesalter, wird heutzutage regelmäßig Sauerstoff therapeutisch verwendet, wie bei der Reanimation (Dzietko, Deindl et al. 2016) oder bei Asthmanfällen ohne Therapieansprechen (Buhl et al. 2021). Auch bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung des Erwachsenen benötigen Patienten in fortgeschrittenen Stadien eine Sauerstoff-Langzeittherapie (Vogelmeier et al. 2018).

Auch reicht z.B. eine RSV-Bronchiolitis beim Säugling häufig aus, dass er, auf Grund einer Hypoxie, für einen begrenzten Zeitraum sauerstoffpflichtig wird (Westhoff et al. 2015).

Hierbei sind die Auswirkungen von reinem Sauerstoff, insbesondere auf einen sich entwickelnden Organismus, wie den eines Kindes, besonders interessant.

Bereits seit mindestens 1967 ist bekannt, dass Sauerstoff auch schädliche Folgen haben kann, insbesondere in der Neonatologie (Northway, Rosan & Porter 1967). Die beiden bekanntesten schädlichen Folgen sind die Retinopathia praematurorum (Stahl & Göpel 2015) und die bronchopulmonale Dysplasie (Weichert et al. 2013).

Als Folge dieser Erkenntnisse kam es in den letzten Jahren einen Paradigmenwechsel in der Medizin bezüglich der Sauerstofftherapie.

Das Therapieziel wandelte sich von so viel wie möglich zu so wenig wie nötig.

Früher wurden bei vermehrtem Einsatz von Sauerstoff Schäden in Kauf genommen oder diese waren noch nicht bekannt. Heutzutage versucht man, durch Reduktion der Sauerstofftherapie auf das Nötigste Schäden zu minimieren.

So sollen zum Beispiel bei der Reanimation Kinder zuerst mit einem normalen Sauerstoffanteil der Raumluft (21% Sauerstoff) oder nur leicht erhöhtem Sauerstoffanteil (30% bei reifen Neugeborenen) beatmet werden. Der Sauerstoffgehalt der Beatmungsluft sollte erst weiter erhöht werden, wenn sich unter dieser Therapie der Sauerstoffgehalt im Blut nicht normalisiert (Dzietko, Deindl et al. 2016, J. M. Perlman et al. 2010).

Da bisher noch nicht genau erforscht ist, welcher Sauerstoffgehalt über welche Zeit schädlich ist, gibt es für die Reanimation zwar diese Empfehlungen, aber noch keine eindeutigen Leitlinien (Dzietko, Deindl et al. 2016).

Im Gegensatz dazu ist bei einigen Erkrankungen wie zum Beispiel der COPD im Erwachsenenalter die Sauerstofftherapie fest in den Therapieleitlinien verankert. Aber auch hier werden Nachteile von zu viel Sauerstoff, wie die Hemmung des Atemantriebs, herausgestellt und dem Nutzen entgegengestellt (Vogelmeier et al. 2018).

Weiterhin stellt sich die Frage, ob und welche negativen Auswirkungen zu viel Sauerstoff auf die unterschiedlichen Organsysteme hat und ob es die Möglichkeit gibt, diese zum Beispiel medikamentös zu verhindern. Falls das Neugeborene auf Grund seiner Grunderkrankung auf eine Sauerstoffbehandlung angewiesen ist, könnte man so optimaler Weise Spätfolgen für das gesamte Leben vermeiden. So könnte man den maximalen Nutzen

bei möglichst geringster schädlicher Auswirkung erzielen.

Gleichzeitig wird zunehmend aber auch die Auswirkungen von zu wenig Sauerstoff und zu viel Kohlendioxid auf den Organismus erforscht, um auch Schäden von zu wenig Sauerstofftherapie zu ermitteln (Munshi & Ferguson 2020).

## 2.2 Auswirkungen der Hyperoxie auf die Lunge

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, ist eine seit langem untersuchte Auswirkung von Sauerstoff auf die Lunge die bronchopulmonale Dysplasie.

Erstmals beschrieben wurde sie 1967 (Northway, Rosan & Porter 1967). Mit der zunehmenden Anzahl von überlebenden Frühgeborenen wurde sowohl die Sauerstoffbeatmung, als auch die Erforschung von Schäden wie der bronchopulmonale Dysplasie bedeutsamer.

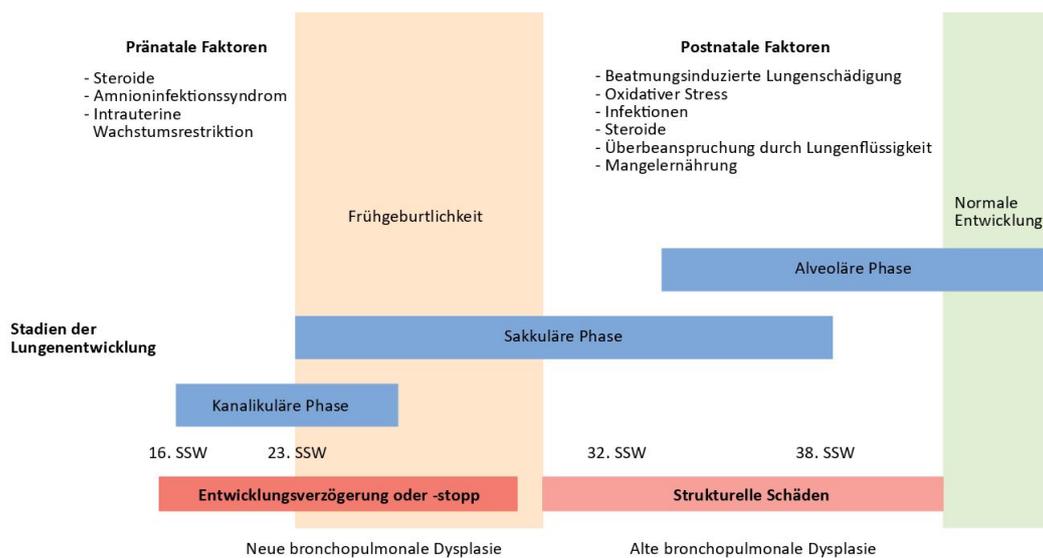


Abbildung in Anlehnung an L. Davidson et al. (2017)

Abbildung 1: Bronchopulmonale Dysplasie

In Abbildung 1, angelehnt an L. Davidson et al. (2017), wird die Unterscheidung der Definitionen der bronchopulmonalen Dysplasie dargestellt. So wird die alte Definition, welche sich auf eine strukturelle Zerstörung des Lungengewebes auf Grund von Auswirkungen von zum Beispiel Sauerstoff oder Beatmung nach der Geburt bezieht, einer neuen Definition gegenüber gestellt, dessen Schäden sich vor der Geburt oder im Rahmen einer Frühgeburt auf Grund von zum Beispiel Steroiden manifestieren und zu einem Entwicklungsstopp oder einer Verzögerung führen. Die Schäden, welche sich schlussendlich manifestieren, basieren auf den Entwicklungsstufen der Lunge im Embryo bzw. des Frühgeborenen (Davidson & Berkelhamer 2017).

Bei der bronchopulmonalen Dysplasie kommt es zu einer grundlegenden Atemproblematik, welche im Verlauf

zu Komplikationen wie Infektionen, intraventrikuläre Blutungen, Phasen von Hypoxie und einem erhöhten Risiko von Gehirnschäden führen kann. (Anderson & Doyle 2006).

Schon alleine durch Schäden an der Lunge, wie durch die bronchopulmonale Dysplasie, können also Gehirnschäden, sowie eine Intelligenzminderung auftreten (Anderson & Doyle 2006). Zusätzlich stellt sich darüber hinaus die Frage, ob und welche direkten Einflüsse die Hyperoxie auf das Gehirn hat.

### 2.3 Auswirkungen der Hyperoxie auf das Gehirn

In der normalen Entwicklung des Gehirns spielen verschiedene Mechanismen wie Zellentwicklung und -vermehrung, Migration, Gliazellvermehrung, Wachstum von Axonen und Dendriten, Synapsenentstehung und Myelinisierung eine wichtige Rolle (Stiles & Jernigan 2010).

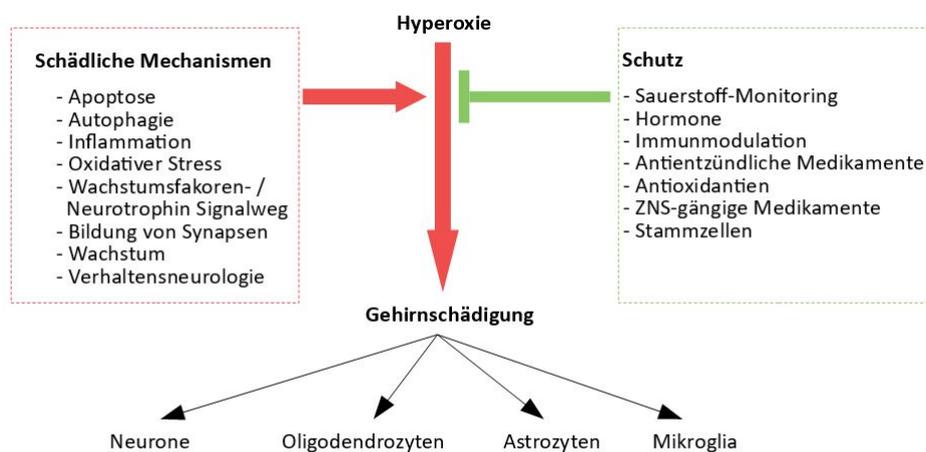


Abbildung in Anlehnung an Reich et al. (2017)

Abbildung 2: Auswirkung der Hyperoxie auf das Gehirn

Abbildung 2, in Anlehnung an Reich et al. (2017), fasst die schädlichen Auswirkungen von Hyperoxie wie Apoptose oder Inflammation mit Auswirkungen auf das Synapsenwachstum, Zellvermehrung und neurologisches Verhalten zusammen. Als mögliche protektive Maßnahmen werden, unter anderem, moderate Sauerstofftherapie oder anti-entzündliche Medikamente genannt (Reich et al. 2016).

Bei einer therapeutischen Gabe von Sauerstoff wurden demnach auch schädliche Folgen direkt auf das Gehirn nachgewiesen. So finden sich im Tiermodell neuronaler Zelluntergang und in der Auswirkung dessen Hirnreifeverzögerungen, Defizite im räumlichen Denken und Gedächtnisstörungen (Felderhoff-Mueser, Bittigau et al. 2004, Felderhoff-Mueser, Marco Sifringer et al. 2005, Gerstner et al. 2006, Ramani et al. 2013). An verschiedenen Zelltypen sind Auswirkungen der Hyperoxie nachzuweisen: Neuronen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia (Reich et al. 2016).

Beim Menschen wurden ebenfalls schädliche Folgen wie die Einschränkung der neurokognitiven Leistung im späteren Leben, sowie eine erhöhte Inzidenz von Zerebralpareesen (Collins et al. 2001) nachgewiesen (Anderson & Doyle 2006, Hintz et al. 2005, B. Schmidt et al. 2003).

Es wurde bereits, wie oben schon erwähnt, festgestellt, dass proinflammatorische und proapoptotische Prozesse im Zusammenhang mit der Hirnschädigung durch Hyperoxie stehen (Dzietko, Boos et al. 2008, M. Sifringer, Bendix et al. 2012, M. Sifringer, Brait et al. 2010).

Bislang ist nicht bekannt, auf welche proinflammatorische und proapoptotische Prozesse sich die Hyperoxie exakt auswirkt und ob der Auswirkung entgegengesteuert werden kann. Zudem ist unbekannt, ob Gedächtnisstörungen und Defiziten im räumlichen Denken (als Kernaufgaben des Hippocampus), eine direkte Schädigung dieser Gehirnregion zugrunde liegt (Dekeyzer et al. 2017).

## 2.4 Der Hippocampus

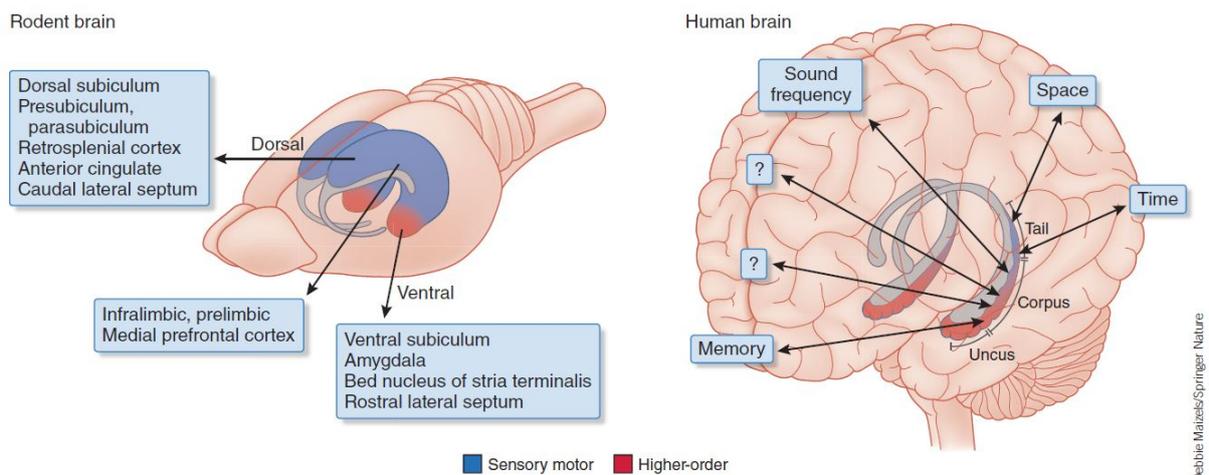


Abbildung 3: Hippocampus. Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Neuroscience, Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition; John Lisman et al., 2017. COPYRIGHT. Advance online publication, Oktober 2017 (doi: 10.1038/nn.4661) Springer Nature, Nature Neuroscience. <https://www.nature.com/articles/nn.4661>

Der Hippocampus liegt im medialen Temporallappen des Gehirns (Axmacher et al. 2007) und ist Bestandteil des limbischen Systems (Akert & Hummel 1963).

Der Hippocampus besteht aus zwei Falten grauer Substanz: dem Cornu ammonis und dem Gyrus dentatus (Dekeyzer et al. 2017).

Wie in Abbildung 3 (Lisman, Buzsáki et al. 2017) dargestellt, ist der Hippocampus durch zahlreiche Verbindungen, unter anderem zum parahippocampalen Gyrus und der Area entorhinalis an den Neocortex angeschlossen

und bezieht so viele verschiedene, vorverarbeitete Informationen (Lisman, Buzsáki et al. 2017).

Zudem bestehen Verbindungen zur Amygdala und zu verschiedenen regulatorischen Systemen wie z.B. dem cholinergischen System. (Treves & Rolls 1994)

Zu den wichtigsten Funktionen des Hippocampus zählen das räumliche und zeitliche Gedächtnis (Dekeyzer et al. 2017). Diese Funktion wurde 1954 von Scoville nach einer radikalen Entfernung beider medialen Temporallappen entdeckt, wonach der Patient unter anterogradem Gedächtnisverlust litt (Scoville & Milner 1957, Dekeyzer et al. 2017).

Auch bei demenziellen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer ist der Hippocampus - sowie andere Regionen - betroffen (Dekeyzer et al. 2017).

Plastizität ist eine wichtige Eigenschaft des Hippocampus. Sie ermöglicht eine dauerhafte Umstrukturierung während und nach einem Lernprozess und trägt dadurch zu Gedächtnis und Gedächtnisanpassung bei (Treves & Rolls 1994).

Bei möglicherweise durch Sauerstoffgabe hervorgerufenen Schäden im Hippocampus stellt sich die Frage, ob sie durch die alleinigen Auswirkungen von Hyperoxie auf die im Hippocampus enthaltenen Neuronen erklärt werden können, oder ob die Hyperoxie sich eher auf den Zusammenschluss von verschiedenen Gewebearten, Gliazellen und Neuronen und vielen weiteren Zellen auswirkt.

Es ist zudem wichtig, bei den bereits bekannten Effekten von Sauerstoff auf das Gehirn genau zu unterscheiden, welche Zelltypen bisher untersucht wurden.

## 2.5 HT22-Neuronen

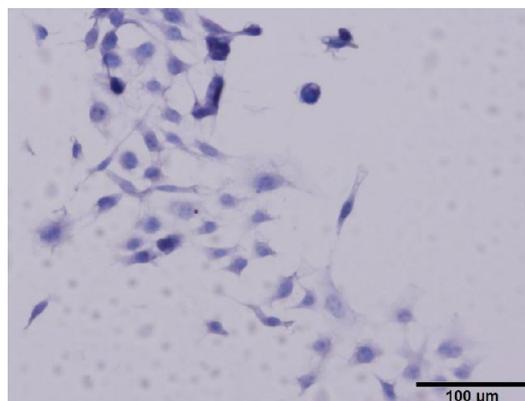


Abbildung 4: HT22 Neuronen

Die HT-22 Zellen (Abbildung 4) sind immortalisierte Neuronen des Hippocampus aus der Maus (Nagase et al. 2020).

In der Forschung ist diese Zelllinie beliebt für die Erforschung von oxidativem Stress bei unterschiedlichsten Krankheitsbildern (Davis & Maher 1994).

So werden sie zum Beispiel in der Erforschung des Neuronen-Untergangs durch oxidativen Stress bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Parkinson oder Alzheimer verwendet (Nagase et al. 2020).

## 2.6 Inflammation, IL6-Zytokinwirkung, Gliose

Es wurde gezeigt, dass unter hyperoxischen Bedingungen im Gehirn proinflammatorische Prozesse stattfinden (Dzietko, Boos et al. 2008, M. Sifringer, Brait et al. 2010, M. Sifringer, Bendix et al. 2012). In diesem Abschnitt werden verschiedene Komponenten der Inflammation weiter erläutert.

Ein wichtiger Bestandteil der Inflammation sind die Zytokine.

Zytokine haben eine hormonähnliche Wirkung auf den Wirkort und können dort unter anderem Entzündungskaskaden, Immunabwehr, Apoptose und Reparaturvorgängen einleiten (Loppnow 2001). Sie sind für den Austausch zwischen den Zellen zuständig (Heinrich et al. 1998).

Wichtige Zytokine und deren Regulatoren sind Interleukine wie IL6 und IL1 beta, TNF alpha, MCP 1 und TGF beta, sowie die downstream Effektor-Proteine SOCS 3 und Stat3, welche im Folgenden erläutert werden.

Interleukine sind Zytokine, welche aus Glykoproteinen bestehen, und unter anderem zuständig für die Koordination des angeborenen und erworbenen Immunsystems sind (Azodi & Jacobson 2016, Belardelli & Ferrantini 2002). Zu den Zytokinen gehören weiterhin noch Interferone, koloniestimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren (Scheller et al. 2011).

**Interleukin-6** (Abkürzung **IL-6**) ist Bestandteil der pro- aber auch der anti-inflammatorischen Interleukine und ist daher von großer Relevanz für das Immunsystem, sodass es in dieser Arbeit genauer untersucht wird.

Interleukin 6 selbst ist ein kleines glykosiertes Protein von 21-28 kDa und besteht aus 4 Helices. Es bindet an seinen Rezeptor IL-6R. Das Glykoprotein gp130 wird durch die Aktivierung des Interleukin 6 -Rezeptors, durch Proteolyse durch eine Metalloprotease ADAM, zu einem Homodimer umgeformt. Es setzt dann die Signalkaskade, unter anderem, über den JAK/STAT, Erk und PI3K Signalweg fort (Scheller et al. 2011).

Bei einer akuten Entzündungsreaktion setzen unter anderem Endothelzellen, durch Stimulation von Interleukin 1 beta oder TNF alpha, Interleukin 6 frei, welches zu der Infiltration der neutrophilen Granulozyten führt. Durch die Aktivierung des Interleukin 6- Rezeptors kommt es zu einer Stimulation der Freisetzung von Monozyten und T-Zellen. Zudem fördert Interleukin 6 in dieser Phase die Apoptose der neutrophilen Granulozyten. Monozyten und T-Zellen übernehmen die Entzündungsreaktion nach circa 24-48 h, damit die ausgeschütteten Proteasen der neutrophilen Granulozyten keinen weiteren Schaden hervorrufen. Zudem wird die Leukozyten-Migration gefördert (Scheller et al. 2011).

Darüber hinaus fördert Interleukin 6 die B- und T-Zell-Differenzierung. Es stimuliert die Antikörperproduktion von B-Zellen und der Vermehrung von B-Zellen. So konnte bei B-Zell-Tumoren ein erhöhtes Interleukin 6 festgestellt werden. Zudem fördert Interleukin 6 die CD4- T-Helferzellen, welche durch das zwischengeschaltete Interleukin 21 stimuliert werden. Auch durch die weiteren Signalkaskaden über Stat3 und SOCS wirkt sich Interleukin 6 positiv auf die Differenzierung von T-Zellen aus (Scheller et al. 2011).

Es scheint einen Zusammenhang zwischen Interleukin 6 und dem Zellmetabolismus zu geben. So schütten

Muskelzellen während der Arbeit vermehrt Interleukin 6 aus, aber auch Adipozyten bei übergewichtigen Personen. Dies führt zu der Annahme, dass es bei Übergewicht zu einer stetigen unterschweligen Inflammation kommt (Scheller et al. 2011).

Interleukin 6 zeigt ebenso Auswirkungen auf die Ausschüttung von Akute-Phasen-Proteinen und unterstützt die Zellreparatur von Organen (Croker et al. 2003).

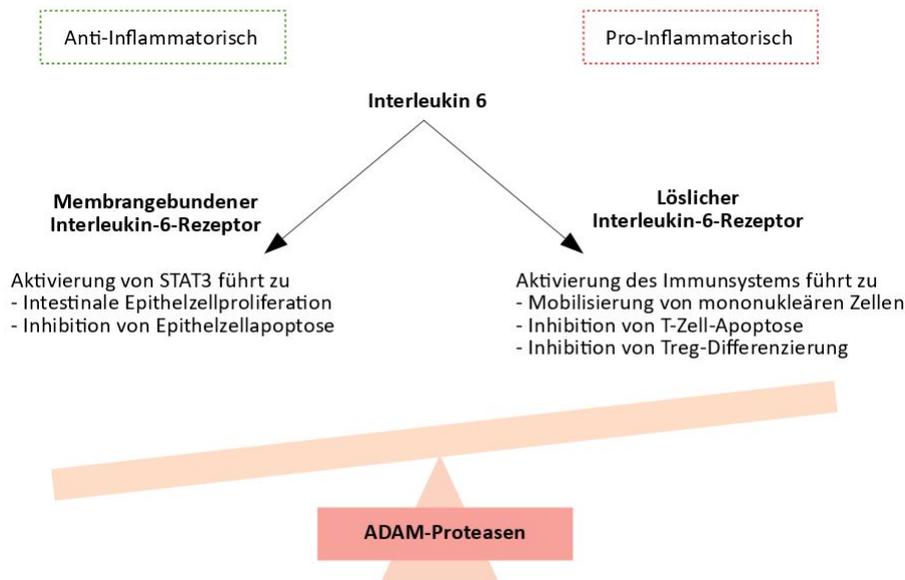


Abbildung in Anlehnung an Scheller et al. (2001)

Abbildung 5: Funktionen Interleukin 6

Abbildung 5, in Anlehnung an Scheller et al. (2011), zeigt einen Überblick über die Funktionen von Interleukin 6 und seinen Rezeptoren. Wie bereits erwähnt, wirkt Interleukin 6 pro-inflammatorisch, indem es sich auf Monozyteneinstrom und T-Zell-Differenzierung auswirkt und die Apoptose von T-Zellen hemmt. Treg beschreibt hier die regulatorischen T-Zellen. Auf der anderen Seite wirkt sich Interleukin 6 anti-inflammatorisch über die Stat3- Signalkaskade aus, indem es die Zellproliferation von intestinalen Epithelzellen fördert und deren Apoptose hemmt. Zu welcher Auswirkung es kommt - pro- oder anti-inflammatorisch - entscheidet sich, je nachdem ob Interleukin 6 an einen membrangebundenen oder an einen löslichen Interleukin-6-Rezeptor bindet (Scheller et al. 2011).

IL-6 steht in der Lunge in Verbindung mit der sauerstoffinduzierten Gewebeschädigung. Die IL-6-Genexpression wird unter Hyperoxie gesteigert und die Blockade von IL-6 führt zu einer Reduktion der Schädigung (Weichelt et al. 2013, Kim et al. 2010).

Ein weiteres durch Hyperoxie erhöhtes Zytokin, bzw Interleukin, ist Interleukin 18.

**Interleukin-18** kommt hauptsächlich in den Mikroglia-Zellen vor. Interleukin 18 stimuliert die MMP- und weitere proinflammatorische Zytokin-Produktion wie TNF und Interleukin 1 beta. Zudem fördert es den Austritt von Leukozyten und Makrophagen aus den Blutgefäßen. Hierbei stimuliert Interleukin 18 Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, welche die Diapedese fördern. Zudem stimuliert Interleukin 18 die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, welches wiederum neurotoxische Enzyme freisetzt. Zudem wird die Expression von FasL

von Mikroglia, Oligodendroglia und Astrozyten stimuliert, welches zu Apoptose führt (Felderhoff-Mueser, O. I. Schmidt et al. 2005).

Interleukin 18 und ein weiteres wichtiges Interleukin 1 beta, deren Synthese über Caspase-1 stimuliert und katalysiert wird, spielen eine Rolle in der Hyperoxie-induzierten Apoptose (Felderhoff-Mueser, Marco Sifringer et al. 2005). So zeigen sich in den Versuchen von Felderhoff-Mueser et al. (Felderhoff-Mueser, Marco Sifringer et al. 2005, Felderhoff-Mueser, O. I. Schmidt et al. 2005) diese beiden Interleukine unter Hyperoxie erhöht.

**Interleukin-1 beta**, gehörend zu der Interleukin 1-Familie, ist ein zentraler Baustein der Inflammation. Es besitzt viele pleiotrope Effekte. Ausgeschüttet nach Verletzungen oder Infektionen aktiviert es, unter anderem, Lymphozyten und induziert Reparaturmechanismen. Zudem besitzt es einen synergistischen Effekt zum Tumornekrosefaktor (Dinarello 1988, Garlanda, Dinarello & Mantovani 2013).

Interleukin 1 beta kann sich aber auch proapoptotisch über den Signalweg via Caspase 1 auswirken (Dapaah-Siakwan et al. 2019). Dies wird im Kapitel 2.8 weiter erläutert.

In diesem Signalweg mit Interleukin 1 beta, Caspase 1 und auch Interleukin 18 zeigt sich ein Zusammenhang zu sauerstoffinduzierter Hirnschädigung. In Versuchen von Felderhoff-Mueser et al. zeigt sich unter hyperoxischen Bedingungen (80% Sauerstoff) nach 12 Stunden ein Anstieg des Zelluntergangs von Neuronen und zudem ein Anstieg der mRNA-Expression von Caspase 1, Interleukin 1 beta, Interleukin 18 und dem Interleukin 18-Rezeptor. Durch ein Knockout der Interleukin-1-Rezeptor-assoziierten Kinase 4 (IRAK-4), welche im Zusammenhang mit Interleukin 1 beta und Interleukin 18 steht, zeigt sich kein neuronaler Schaden durch Hyperoxie mehr (Felderhoff-Mueser, O. I. Schmidt et al. 2005).

Ein Hemmen von Interleukin 1 beta zeigt auch in Versuchen mit Mäusen nach Hirnverletzungen eine geringere Aktivierung der Mikroglia, vermeidet das Absterben von Parvalbumin-positiven Interneuronen und schützt vor einer Veränderung der Dichte von dopaminergen Strukturen (Ozen et al. 2020).

**Tumornekrosefaktor alpha**, im Folgenden **TNF alpha** genannt, ist auch ein wichtiger Baustein der Inflammation und besitzt ebenfalls mannigfaltige Effekte auf seine Zielzellen. Es stimuliert unter anderem die Leukozytenanheftung an das Endothel und hat somit einen deutlichen Einfluss auf die Immunabwehr. Zudem stimuliert es wiederum Interleukin 1 als proinflammatorisches Interleukin (Mackay et al. 1993).

Im Gehirn zeigt sich sowohl eine schützende Wirkung von TNF alpha auf metabolische, toxische und oxidative Reize, als auch eine positive Auswirkung auf neuronalen Schaden und Schaden von Gliazellen, insbesondere bei neurodegenerativen Erkrankungen (Mattson et al. 1997).

Unter hyperoxischen Bedingungen zeigten Lungenfibroblasten eine erhöhte mRNA-Expression von TNF alpha (You et al. 2019). Auch in Versuchen, welche die protektiven Auswirkungen von Hyperoxie auf ischämische Hirnschäden untersuchen, zeigt sich eine erhöhte TNF alpha-Konzentration im Serum nach Hyperoxie (Bigdeli et al. 2008).

**Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1**, im Folgenden **MCP1** genannt, nimmt Einfluss auf die Migration und Infiltration von Makrophagen und deren Vorläufern, den Monozyten, und ist somit ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin (Deshmane et al. 2009).

In Versuchen, um die Auswirkung von Alkohol auf das fetale Gehirn zu untersuchen, zeigt sich während des Anstiegs von Neuroinflammation, der Aktivierung der Mikroglia und Neurodegeneration gleichzeitig ein Anstieg

der Expression von MCP1. Durch eine Inhibition von MCP1 kann die Aktivierung der Mikroglia, Neuroinflammation und Apoptose reduziert werden (K. Zhang et al. 2018).

Unter hyperoxischen Bedingungen zeigte ein Versuch mit Mäusen eine erhöhte Expression von MCP1 im Lungengewebe. Der Knockout des C-C Chemokin Rezeptors 2 (CCR2), als Teil des MCP-1-Signalwegs, zeigte eine erhöhte Expression von MCP1 gegenüber den Wildtyp-Mäusen und unterstützt die Hypothese, dass der MCP1-CCR2 Signalweg protektiv gegen sauerstoffinduzierte Schäden in der Lunge wirken kann (Okuma et al. 2006).

**Transforming growth factor beta**, im Folgenden **TGF beta** genannt, kontrolliert Wachstum und Entwicklung von Zellen während Entzündungs- und Reparaturvorgängen. In vivo wurden proinflammatorische Effekte und Fibrogenese beschrieben, wohingegen in vitro inhibitorische Effekte entdeckt wurden, welche Heilvorgänge begünstigen (Clark & Coker 1998).

Im Gehirn zeigt sich eine regulatorische Funktion von TGF beta auf das Zellüberleben und die Differenzierung, die Angiogenese im Gehirn, das Gedächtnis und die Plastizität. Zudem zeigt sich ein spezieller Zusammenhang zu Differenzierung und Funktion von Astrozyten (Diniz et al. 2019).

In Versuchen mit Hyperoxie zeigt sich bei neugeborenen Ratten ein Anstieg der Expression von TGF beta im Gehirn. Zudem zeigt sich eine Aktivierung des Smad/MAPK Signalwegs, der in Abbildung 7 ebenfalls dargestellt wird, welches unter anderem zum Wachstum von Astroglia führt (T. Zhang et al. 2019; Herrera, Chen & Schubert 2010). Durch einen Knockout dieses Signalwegs zeigt sich eine Abnahme der sauerstoffinduzierten Hirnschädigung (T. Zhang et al. 2019).

Die Aufgabe und Wirkung von **suppressor of cytokine signaling 3**, im Folgenden **SOCS3** genannt, und **signal transducer and activator of transcription 3**, im Folgenden **STAT 3** genannt, ist in der folgenden Abbildung Nr. 6 dargestellt.

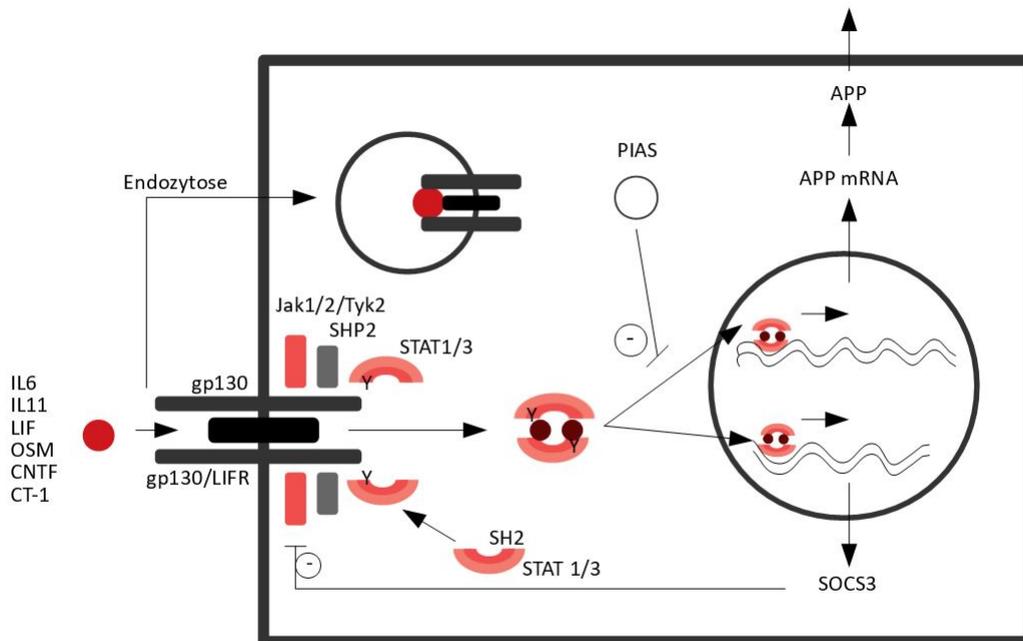


Abbildung in Anlehnung an Heinrich et al. (1998)

Abbildung 6: Syntheseweg IL6, SOCS3 und STAT3

Der dargestellte Syntheseweg in Abbildung Nr. 6 (angelehnt an Heinrich et al. 1998) zeigt die Induktion der SOCS-Synthese durch Endozytose von, unter anderem, IL-6. Mit Hilfe von STAT 1/3 induziert diese Verbindung die SOCS-Synthese. SOCS inhibiert dann den Cytokin-Signalweg, indem es Jak1/2/Tyk2 inhibiert (Heinrich et al. 1998).

**SOCS3** fungiert somit als negativer Feedbackmechanismus des JAK/STAT-Signalwegs und wird durch Interleukin 6 und STAT3, unter anderem, induziert (Heinrich et al. 1998). Es inhibiert somit den weiteren Signalweg über weitere Cytokine und gilt als allgemeiner Regulator von Cytokinantworten, insbesondere von Interleukin 6. Bei einer Unterdrückung von SOCS3 kommt es zu einer verlängerten STAT3-Aktivierung (Crocker et al. 2003). SOCS 3 zeigt zum Beispiel bei Adipositas eine erhöhte Expression im Gehirn, was im Zusammenhang zu der Leptinresistenz stehen könnte (Engin 2017).

Es gibt aktuell keine Versuche, die die Auswirkung von Hyperoxie auf SOCS 3 zeigen. In Versuchen von Galam et al. wurde gezeigt, dass durch eine erhöhte Expression von SOCS 1 in der Mäuselunge sauerstoffinduzierte Schäden vermieden werden können (Galam et al. 2015).

**STAT 3** ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der intrazellulären Kommunikation. Dies zeigt sich, da eine Knock-out Mutation von STAT 3 letal verläuft. Es unterstützt Interleukin 6 in der letztendlichen Wirkung der Induktion von Akute-Phasen-Proteinen, Stimulation von B-Zellen, Differenzierung von Monozyten und dem Bewahren der Pluripotenz von Stammzellen für die Regeneration (Levy & Lee 2002).

STAT 3 unterstützt auch im Gehirn den Zellzyklus, das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und verhindert Apoptose. So wurde auch bei Gliomzellen eine erhöhte Aktivität von STAT 3 nachgewiesen (Swiatek-Machado & Kaminska 2020).

Durch eine Deletion von STAT 3 konnte in einem Versuch mit Mäusen unter hyperoxischen Bedingungen gezeigt

werden, dass es zu vermehrten Schäden von Epithelzellen der Lunge und vermehrten Entzündungsreaktionen in der Lunge kommt. Somit spielt STAT 3 eine wichtige Rolle, um sauerstoffinduzierte Schäden zu vermeiden (Hokuto et al. 2004).

Weitere proinflammatorische Gene und Proteine sind CTGF, GFAP und Iba1.

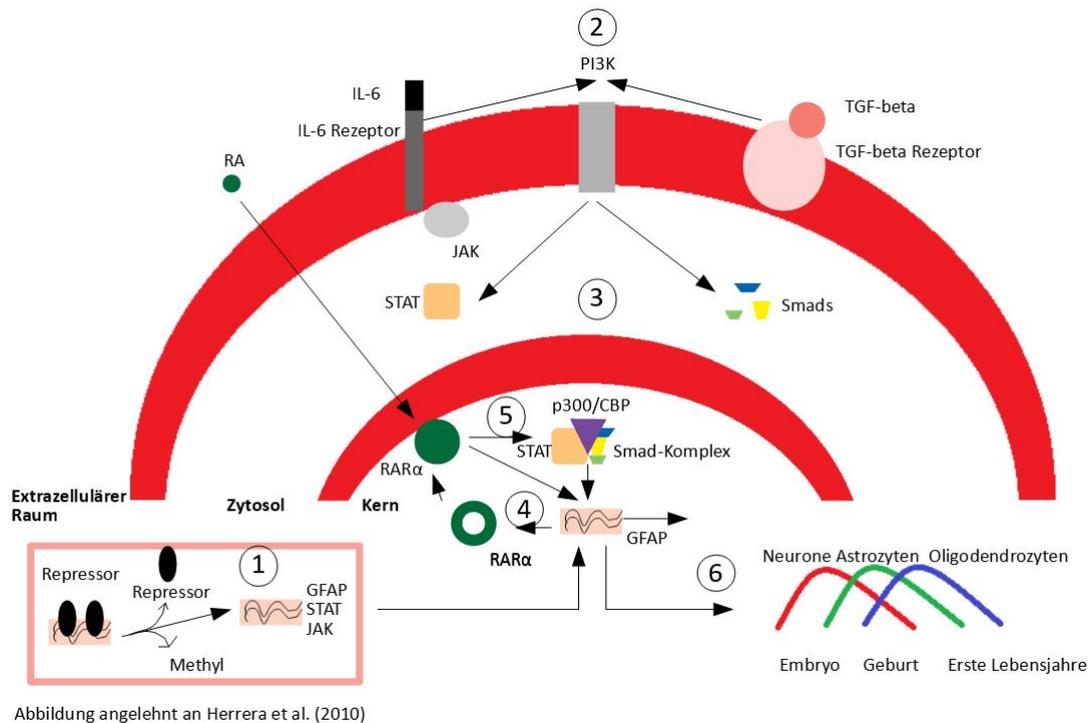


Abbildung 7: Synthese IL6, GFAP

Abbildung 7 zeigt den Zusammenhang von IL6 zu GFAP (angelehnt an Herrera et al. 2010 (Herrera, Chen & Schubert 2010)).

**GFAP (Glial fibrillary acidic protein)** ist ein Basismarker der Entwicklung von Astroglia, aber auch Neuronen. Es zeigt sich essenziell für die Regeneration und Plastizität von Astrozyten und für die reaktive Gliose. Zudem zeigen sich verschiedene Isoformen von GFAP in verschiedenen Subtypen von Astrozyten (Middeldorp & Hol 2011).

Über den JAK/STAT-pathway, stimuliert durch IL6 und TGF beta, wird die Expression von GFAP stimuliert. Somit zeigt sich ein pro-inflammatorisches Zytokin wie Interleukin 6 stimulierend für Astroglia-Wachstum (Herrera, Chen & Schubert 2010).

In Versuchen mit der Retina von Katzen, zur Analyse der Retinopathia prematurorum, zeigte sich durch Hyperoxie keine Änderung der Expression von GFAP in der Retina (Lewis et al. 2004).

**CTGF (Connective tissue growth factor)** wirkt aktivierend auf Angiogenese, Neovaskularisation, Entwicklung des knöchernen Skeletts und Wundheilung. CTGF wirkt gemeinsam mit TGF beta (Abreu et al. 2002).

In Versuchen in Zellkulturen konnte durch die Stimulation durch CTGF, als freigesetzter Marker bei traumatischer Gehirnverletzung, eine erhöhte Expression von GFAP in Astrozyten festgestellt werden. Auch CTGF selbst kann Astrozyten aktivieren und unterstützt somit die Neuroinflammation (Lu et al. 2019).

In der Lunge zeigt sich zudem eine erhöhte Expression von CTGF durch Hyperoxie. Durch eine Behandlung mit einem CTGF-Antikörper konnte eine bessere Alveolarisation und Gefäßentwicklung und weniger pulmonale Hypertension gezeigt werden (Xinbao Wang, Cui & S. Wu 2019).

**Iba 1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1)** wird insbesondere in aktivierten Microglia exprimiert und reguliert deren Funktion (Ito et al. 1998).

Es finden sich aktuell keine Publikationen über die Auswirkung von Hyperoxie auf Iba 1.

## 2.7 Wachstumssignalwege

Neurotrophe Faktoren (auch Neurotrophine genannt) haben einen großen Einfluss auf das Fortbestehen und die Differenzierung von Neuronen (Zurn et al. 1996). Hierfür können sie die Arten von freigesetzten Neurotransmittern der Neuronen anpassen (Barde 1994).

Ohne neurotrophe Faktoren kommt es zu Apoptose der mittels Signalwegen verbundenen Zellen. Die Inaktivierung der Faktoren ist besonders gravierend in der vulnerablen Phase der letzte Mitose während der Zelldifferenzierung (Barde 1994).

Die bisher bekanntesten neurotrophen Faktoren sind die Gruppe um **NGF (nerve growth factor)**, **CNTF (ciliary neurotrophic factor)** und **GDNF (Glial-derived neurotrophic factor)**. Die Signalkaskade der neurotrophinen Faktoren läuft über die Trk-Rezeptoren der Tyrosinkinasen ab. Zudem wirken die neurotrophen Faktoren ebenfalls über p75 (Barbacid 1995).

**BDNF (brain-derived neurotrophic factor)** gehört zu der Gruppe um NGF. Es hat, unter anderem, Einfluss auf das Überleben von sensiblen Nerven des Ganglion inferius des Nervus vagus, retinalen Ganglienzellen und cholinergen Neuronen. BDNF wird auch im Striatum exprimiert, sodass es zudem Auswirkungen auf das Überleben von dopaminergen Neuronen hat (Hyman et al. 1991). Zudem hat BDNF Auswirkungen auf die Neurogenese, die Kommunikation der Synapsen und die Neuroplastizität (Terraneo & Samaja 2017).

Versuche zeigen eine akute Verminderung der Expression von BDNF nach sechs Stunden Hyperoxie von Gehirnen von neugeborenen Ratten. Zudem zeigt sich ein Wiederanstieg der Expression nach 15-20 Stunden in Normalluft. Dies zeigt die Abhängigkeit von BDNF vom Sauerstoff und Sauerstoffgehalt zudem den Zusammenhang mit der Neurodegeneration durch Apoptose während Hyperoxie-Phasen (Terraneo & Samaja 2017).

**GDNF** stimuliert insbesondere das Überleben und die Differenzierung von dopaminergen Neuronen und erhöht deren Dopamin-Aufnahme (Lin et al. 1993).

Es ist zudem für die Migration von Neuronen und das Überleben der Neuronen zuständig. In Studien wurde gezeigt, dass es das angelernte Verhalten auf Stress beeinflusst. In Versuchen mit Hyperoxie wurde eine signifikant höhere Expression im Isocortex von Mäusen gezeigt (Sengoku, Murray & Wilson 2016).

Als Bestandteil der Neurotrophin-Gruppe gilt eigentlich GDNF auch als neuroprotektiver Faktor. Allerdings zeigt sich bei erhöhter GDNF-Expression vermehrt neuronale Schädigung. Bei Nagetieren konnte eine erhöhte Expression von GDNF in Bezug zu neuronalem Untergang im Hippocampus gesetzt werden. Im Rattengehirn zeigt sich eine vermehrte Expression von GDNF nach ischämisch bedingtem strukturellem Gehirnschaden. Zudem zeigt sich vermehrt Astrogliose bei vermehrter GDNF-Expression (Sengoku, Murray & Wilson 2016).

**CNTF** ist für das Überleben und die Differenzierung von sensorischen, sympathischen Nerven und Motoneuronen zuständig. Eine hohe Konzentration an CNTF wurde in peripheren Nerven gefunden. Bei neugeborenen Ratten konnte CNTF bis zur 4. postpartalen Woche nicht nachgewiesen werden (Sendtner et al. 1994).

CNTF reguliert Stammzellen in Mäuse-Embryonen und bei Erwachsenen die Neurogenese. Im Gehirn konnte eine vermehrte Expression von CNTF nach Gehirnschädigung nachgewiesen werden, insbesondere in Astrozyten. So zeigt sich bei Patienten mit Multipler Sklerose eine deutlich vermehrte Expression von CNTF und dessen Rezeptor im Motorcortex (Vernerey et al. 2013).

Im Bezug auf Hyperoxie gibt es nicht viele Veröffentlichungen. In der sauerstoffgeschädigten Retina zeigt sich eine verminderte Angiogenese, wenn CNTF hinzugefügt wird (Bucher et al. 2016). Zudem zeigt sich in der Retina keine Veränderung der Expression von CNTF durch Hyperoxie (Bowers et al. 2001).

**VEGF (Vascular endothelial growth factor)** ist ebenfalls ein Wachstumsfaktor und wird ausgeschüttet in Hypoxie-Zuständen, bei der Anwesenheit von aktivierten Onkogenen und durch das Ausschütten von diversen Cytokinen. Wenn VEGF ausgeschüttet wird, fördert es die Proliferation des Endothels, Zellmigration und unterdrückt Apoptose. Eine vermehrte Ausschüttung von VEGF sieht man insbesondere bei Tumoren für deren Neovaskularisation. VEGF bindet an zwei Tyrosin-Kinase-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 (Neufeld et al. 1999).

In einer Zellkultur von Lungen-Adenokarzinom-Zellen zeigt sich zudem eine vermehrte Expression von VEGF 121 und 165-Proteinen unter Hyperoxie auf die 2 bis 3-fache Menge nach 48 Stunden (Shenberger et al. 2007). Im Gehirn zeigt VEGF zusätzlich zu den bereits genannten Funktionen eine Auswirkung auf Astrozytenproliferation und -migration (Rattner, Williams & Nathans 2019).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die DNA-Synthese, welche durch PCNA und p21 reguliert wird.

**PCNA (proliferating cell nuclear antigen)** wirkt im Zellkern und hat positive Auswirkungen auf die Zellproliferation, insbesondere die DNA-Replikation. So ist PCNA insbesondere in der späten G1- und S-Phase erhöht und zeigt einen niedrigen Nachweis in der G0-G1-Phase des Zellzyklus (Kurki et al. 1986).

Im Frosch-Gehirn wurde PCNA in vielen Gehirnteilen nachgewiesen, wie im Cerebrum, Dienchephalon, Mesencephalon und Metencephalon. Einzig im Hypophysenstiel, in der Epiphyse und in dem Nucleus isthmi des Frosches wurde PCNA nicht nachgewiesen (Raucci et al. 2006).

Unter Hyperoxie verzeichnet man eine Inhibition der PCNA-Expression (Gehen et al. 2007). Die Hyperoxie führt zu einer vermehrten p21-Expression und somit zu einem Stopp der DNA-Synthese (Raucci et al. 2006), was wiederum die DNA-Reparatur unter Hyperoxie fördert (Cai, Sun & Li 2014).

Während PCNA ein Aktivator der DNA-Synthese ist, zeigt sich p21 als Inhibitor der DNA-Synthese. **p21** ist ein Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor und bindet an sich vermehrende Zellen und stoppt deren DNA-Synthese. Dies ist zum Beispiel von Nutzen, wenn die Zelle schädigenden Substanzen wie Doxorubicin ausgesetzt ist (Gartel & Radhakrishnan 2005).

Im Gehirn wirkt sich p21 über PAKs (p21-aktivierte Kinasen) auf diverse Zellen aus. Mikroglia zeigen eine gesteigerte Immunantwort und PAK2 reguliert die Mortalität. In Neuronen sind verschiedene PAKs für Funktion, Wachstum, Transkription und Überleben zuständig. Bei Astroglia zeigt sich eine Auswirkung auf die Immunantwort und die Astrogliose (Civiero & Greggio 2018).

**Doublecortin** ist ein Protein, welches an die Mikrotubuli bindet und diese stabilisiert. Zudem fördert es das

Bündeln der Mikrotubuli, welches diese weiter stabilisiert und damit die Neurogenese fördert (Horesh et al. 1999). Die Expression von Doublecortin kann als Marker der Neurogenese dienen. Zudem zeigt sich eine Expression bei physiologischer oder reaktiver Gliogenese und eine Expression während der Regeneration des Axonenwachstums (Couillard-Despres et al. 2005). Über Auswirkungen von Hyperoxie auf Doublecortin finden sich aktuell keine Veröffentlichungen.

**Erk (Extracellular-signal-regulated kinase)** spielt eine Rolle beim Überleben der Zelle, sowie Differenzierung und Plastizität von Neuronen. Die Kaskade läuft häufig über Tyrosinkinasen ab, allerdings spielen auch Ras und die Kinasen Raf-1 und MEK eine Rolle. Über zwischengeschaltete Systeme wie cAMP/Proteinkinase A und Calcium gibt es eine weite Bandbreite an Funktionen von Erk für die Neuronen (Grewal, York & Stork 1999). Zudem wurde bei Erk gezeigt, dass es ein Überleben von suprachiasmatischen Zellkernen begünstigt, wenn die Zellen unter Glutamat-Einfluss stehen (Terraneo & Samaja 2017). Bezüglich Hyperoxie wurde bei neugeborenen Ratten eine Abnahme der Expression von Erk 12 Stunden nach Hyperoxie gezeigt mit einer vollständigen Normalisierung der Expression nach weiteren 12 Stunden (Terraneo & Samaja 2017).

**Akt**, auch bezeichnet als **Proteinkinase B**, spielt ebenfalls eine Rolle beim Überleben der Zelle, Zellzyklus, Proliferation, Transkription, Migration und Regulation des Metabolismus (Fayard et al. 2005, Brazil & Hemmings 2001). Unter vielen anderen Stimuli wird Akt durch Interleukine, Insulin, NGF, VEGF, Hypoxie und TNF alpha aktiviert (Brazil & Hemmings 2001).

Das Überleben der Zelle bewirkt Akt über eine Förderung der Membranintegrität und eine Hemmung der Cytochrom C-Ausschüttung aus den Mitochondrien (Terraneo & Samaja 2017). Unter Hyperoxie zeigt sich eine verminderte Akt-Expression und Phosphorylierung. Versuche mit neugeborenen Ratten zeigen eine deutlich verminderte Expression 12 Stunden nach Hyperoxie mit Normalisierung nach weiteren 12 Stunden. Versuche mit 28-tägiger Hyperoxie bei Mausgehirnen zeigen ebenfalls eine deutlich verminderte Expression von Akt. Dies zeigt ebenfalls den Zusammenhang von Akt und dem Sauerstoffgehalt (Terraneo & Samaja 2017).

## 2.8 Apoptose

Die Apoptose-Regulatoren BCL2, Bax und Caspase beeinflussen das Apoptose-Verhalten.

**BCL 2 (B-cell lymphoma 2)**, ein Apoptose unterdrückendes Gen, wurde in mutierter, hochregulierter Form in B-Zell Lymphomen gefunden. Hierbei kam es zu unbegrenztem Wachstum. Bei einem übermäßigem Vorkommen von BCL 2 kommt es zu einem verlängerten Zellüberleben und verminderter Apoptose (Reed 1998).

Im Gehirn zeigt sich Bcl 2 als neuroprotektiver Faktor. Es unterdrückt auch hier die Apoptose und fördert das Neuronenüberleben. Zudem zeigt sich eine Aktivierung durch Akt, welches wiederum durch BDNF aktiviert werden kann (Sheikh et al. 2010).

Bcl 2 zeigt sich in moderater Hyperoxie (60% Sauerstoff) erhöht, was das Überleben der Neuronen fördert. In höherprozentiger Hyperoxie (95% Sauerstoff) zeigt sich aber eine deutliche Inhibition von Bcl 2 und demnach die Förderung von Apoptoseprozessen (Zara et al. 2013).

**Bax (Bcl2-alike Protein 4)** fördert hingegen die Apoptose, indem es die Permeabilität der Membranen erhöht und Caspase aktiviert (Cory & Adams 2005).

Im Gehirn zeigt sich Bax neuroprotektiv. Eine Inhibition von Bax unter Hypoxie im Gehirn zeigte eine Reduktion von Schäden an der weißen und grauen Substanz. Im Outcome wurden bei Bax-Inhibition bessere Ergebnisse in Sensomotorik und Gedächtnis festgestellt (Xiaoyang Wang et al. 2010).

Bax zeigt in der Lunge unter Hyperoxie eine vermehrte Expression (Husari et al. 2006).

**Caspase** ist eine Cystein-Protease und spaltet Asparaginsäurereste. Es aktiviert Pro-Cytokine und wirkt somit proinflammatorisch, sowie auch proapoptotisch (Boatright & Salvesen 2003).

Im hyperoxischen Gehirn zeigt sich eine Aktivierung von Inflammasomen, welche IL-1 beta regulieren. IL-1 beta stimuliert die Expression von p30 gasdermin-D, welches für den programmierten Zelltod verantwortlich ist. In Versuchen mit irreversiblen Caspase-1-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass es durch die Inhibition zu einer verminderten IL-1 beta-Konzentration kommt und demnach weniger p30 gasdermin-D ausgeschüttet wird. Die Caspase-1-Inhibition bewirkt zudem eine Zunahme der Zellproliferation in der subgranulären und subventrikulären Zone der Gehirne, welche weniger Atrophie zeigten (Dapaah-Siakwan et al. 2019). Zudem zeigt sich eine vermehrte Aktivität bei Hyperoxie in der Literatur (Dieperink, Blackwell & Prince 2006).

## 2.9 Plastizität

Die Gene und Proteine CAMKII, cfos, Synapsin und GAP 43 sind wichtige Bestandteile der Plastizität von Neuronen.

**Cfos** als Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 zeigt die Aktivierung von Neuronen an. Seine extrazellulären Auswirkungen fördern zelluläre Umstrukturierung und den Aufbau von Gedächtnis. Cfos wird durch neurotrophe Faktoren, Neurotransmitter, Depolarisation oder Calciumeinstrom freigesetzt (Kovács 1998).

Es finden sich aktuell keine Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen von Hyperoxie auf cfos.

**CAMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II)** und seine aktivierte, phosphorylierte Variante sind ein wichtiger Bestandteil des Lernprozesses und des Gedächtnis. Die Kinase wird durch Autophosphorylierung aktiviert und fördert das Langzeitlernen (Lisman, Yasuda & Raghavachari 2012).

CAMKII zeigt unter Hyperoxie keine signifikante Änderung der Expression in Herzzellen von Hühnerfeten (Greco & Gomez 2014).

**Synapsin** und seine phosphorylierte Variante sind wichtig bei der Mobilisation von synaptischen Vesikeln und deren Transport und beeinflussen so den Neurotransmitter-Ausschuss von Neuronen. Sie sind ein wichtiger Faktor der neuronalen Plastizität (Chi, Greengard & Ryan 2001).

Ein Versuch von Serdar et al. zeigte bei Mäusen, welche eine erhöhte neuronale Ras-Aktivität durch Mutation und Überexpression des Synapsin-Promotors besitzen, einen Schutz von Oligodendrozyten vor Apoptose durch Hyperoxie (Serdar et al. 2018).

**GAP 43 (Growth associated Protein 43)** reguliert über Signalwege das Wachstum von Axonen. Bei einem übermäßigen Ausschuss kommt es zu spontanen Synapsenneuformungen, zum Beispiel nach Verletzung. Eine Hemmung von GAP 43 unterbindet das Axonen-Wachstum und endet tödlich. Im Menschen wird GAP 43 besonders im Neocortex und im limbischen System nachgewiesen (Benowitz & Routtenberg 1997).

In Versuchen mit induzierter hyperoxischer Retinopathie bei Ratten zeigt sich die Expression von GAP 43 erhöht (Chung et al. 2010).

## 2.10 Stand der Forschung

Bereits 2013 geht die Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Dötsch und Frau Dr. Hucklenbruch-Rother der Frage nach, ob IL-6, wie in der Lunge auch, eine zentrale Rolle in der sauerstoffinduzierten Neuroinflammation spielt und wie sich die Dynamik der molekularen Schädigungsmechanismen in der sauerstoffinduzierten Hirnschädigung darstellt.

Die Antworten auf diese Fragen sollen zeigen, ob es therapeutische Ansätze gibt, ob und wann eine spezifische Hemmung von IL-6 einen Angriffspunkt zur Prävention der sauerstoffvermittelten Hirnschädigung bietet. In diesem Kapitel werden unveröffentlichte Daten aufgezeigt, auf die die weiteren Versuche aufbauen.

In Abbildung 8 gezeigt sind die Ergebnisse des *in vitro* und *in vivo* Experiments.

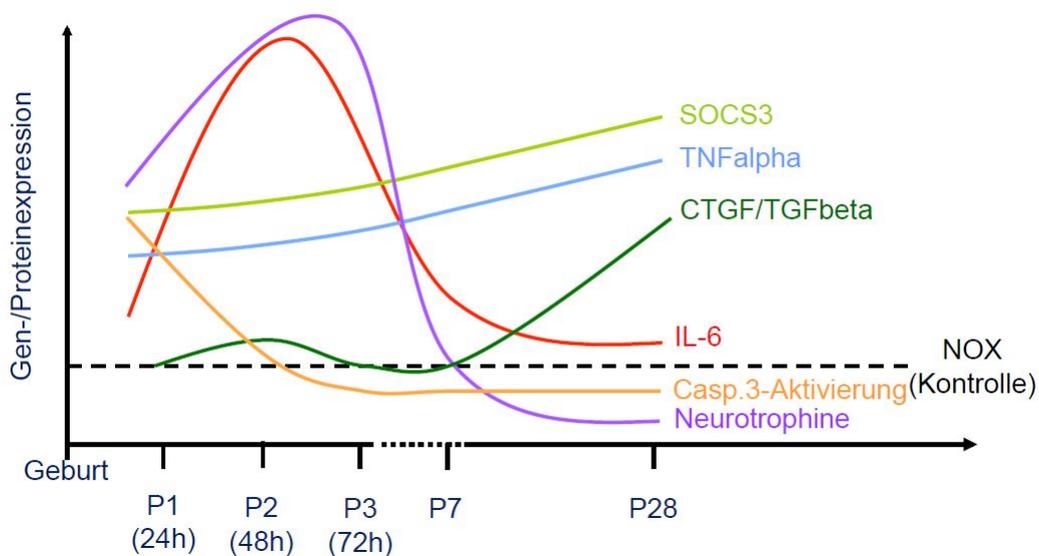


Abbildung 8: Übersicht Gen-/ Proteinexpression der bisher durchgeführten Versuche

Im **in vivo Versuch** wird der Gyrus dentatus von 7 und 28 Tage alten Mäusen, gehalten in Hyperoxie (85 % Sauerstoff) und in Normoxie, ebenfalls auf die Auswirkungen auf Neuroinflammation, Proliferation, Fibrose und Apoptose untersucht.

Zudem wird ein ansonsten identisch aufgebauter **in vitro Versuch** an den HT22-Zellen zum Zeitpunkt 24, 48 und 72 Stunden, sowie 7 Tage, mit und ohne einem IL 6-neutralisierendem Antikörper durchgeführt.

Im Folgenden werden beide Versuche gemeinsam zusammengefasst und die Gen- und Proteinexpression in zeitlichen Zusammenhang gesetzt.

Bezüglich der **Neuroinflammation** zeigt sich ein deutlicher Anstieg der relativen IL6-mRNA-Expression in den

Hyperoxie-Gruppen bis 72 Stunden und ein sich anschließender deutlicher Abfall bis 7 Tagen. Bis zu 28 Tage zeigt sich ein stabiles Expressionslevel. Die relative IL6-mRNA-Expression in den Hyperoxie-Gruppen zeigt sich zu allen Zeitpunkten erhöht im Vergleich zu den Normoxie-Gruppen. Bei dem Versuch mit dem IL6-neutralisierenden Antikörper zeigt sich eine Reduktion der relativen IL6-mRNA-Expression um ungefähr die Hälfte.

Auch die relative TNFalpha-mRNA-Expression zeigt eine größtenteils signifikante Erhöhung mit Anstieg über den gesamten Zeitraum in den Hyperoxie-Gruppen. Bei dem Versuch mit dem IL6-neutralisierendem Antikörper zeigt sich kein Unterschied zu den Gruppen ohne IL6-Blockade.

Die relative SOCS3-mRNA-Expression zeigt ebenfalls eine größtenteils signifikante Erhöhung mit Anstieg über den gesamten Zeitraum in den Hyperoxie-Gruppen. Bei der relativen SOCS3-mRNA-Expression zeigt sich bei 24 und 72h (hier signifikant) eine Abnahme bei der Hyperoxie-Gruppe mit IL6-neutralisierendem Antikörper im Vergleich zu den Hyperoxie-Tieren ohne Antikörper. Bei 48h zeigt sich ein Anstieg der Expression in der Antikörper-Gruppe.

Die relativen mRNA-Expressionen von NGF und NT4/5, welche für die **Proliferation und Differenzierung** stehen, zeigen einen größtenteils signifikanten Anstieg auf das bis zu 2,8-fache bis zu 72 Stunden in den Hyperoxie Gruppen. Nach 7 Tagen fällt die relative mRNA-Expression bei beiden Genen in den Hyperoxie-Gruppen auf etwa die Hälfte (NT4/5) der Normoxie-Gruppen bzw. fast auf 0 (NGF) ab. Die relative mRNA-Expression von NGF zeigt einen Anstieg bis zu 72 Stunden (hier signifikant) in der Hyperoxie-Gruppe mit IL6-neutralisierendem Antikörper im Vergleich zu der Hyperoxie-Gruppe ohne Antikörper.

Bezüglich der **Fibrose und des Remodelings** zeigen sich bei CTGF bis 72h ähnliche Ergebnisse in beiden Gruppen, dann ein signifikanter Anstieg der relativen CTGF-mRNA-Expression ab 7 Tagen in den Hyperoxie-Gruppen auf das 4-fache. Die relative mRNA-Expression von TGF beta zeigt ebenfalls einen zunehmenden Anstieg in den Hyperoxie-Gruppen bis zu 28 Tagen. Im Versuch mit dem IL6-neutralisierendem Antikörper zeigt sich bei CTGF eine signifikante Induktion der CTGF-Expression ab 48 Stunden im Vergleich zu den Gruppen ohne Interleukin 6-Blockade. Bei TGF beta zeigt sich in der Gruppe mit dem IL6-neutralisierendem Antikörper ein gleichbleibendes Expressionslevel wie bei der Normoxie-Gruppe. Der Anstieg der Expression wie in der Gruppe ohne IL6-Blockade bleibt aus.

Die relative Casp3-Protein-Expression, welches die **Apoptose** repräsentiert, zeigt einen nicht signifikanten Anstieg in den Hyperoxie-Gruppen nach 24 Stunden, einen nicht signifikanten Abfall nach 48 Stunden und einen weiteren nicht signifikanten Abfall nach 72h auf das 0,25-fache der Normoxie-Gruppen. Nach 7 und 28 Tagen zeigen sich ähnliche Ergebnisse in beiden Gruppen.

## 2.11 Arbeitshypothese und Fragestellung

Es ist eine sehr interessante Forschungsfrage, ob IL-6, wie in der Lunge bereits nachgewiesen, auch im Gehirn, spezifisch im Hippocampus, in Verbindung zur sauerstoffinduzierten Neuroinflammation steht, beziehungsweise zu anderen Veränderungen eine Beziehung hat.

Die bisher durchgeführten Versuche zu dieser Thematik zeigen eine Induktion der Gen-/Proteinexpression von

Inflammation und eine verminderte Gen-/Proteinexpression bezüglich Neurotrophinen und Apoptose im zeitlichen Verlauf (siehe Abbildung 8). Auf dieser Grundlage erweitern wir die Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit im Bezug auf Inflammation, IL6-Zytokinwirkung, Gliose, Wachstumssignalwege, Apoptose und Plastizität.

In vivo wird mit Hilfe von Knock-out Mäusen getestet, ob eine Blockade von IL-6 einen Schutz vor Veränderungen durch Hyperoxie bietet. In der Zellkultur wird für diese Fragestellung ein IL6-Antikörper verwendet.

Auf dieser Grundlage entsteht die Forschungsfrage, auf welche proinflammatorische und proapoptische Prozesse sich die Hyperoxie exakt auswirkt und ob der Auswirkung entgegengesteuert werden kann.

Falls ein Schutz festzustellen ist, könnte dies ein Ansatzpunkt für eine medikamentöse Blockade von IL-6 gegebenenfalls auch bei Neugeborenen zum Abwenden der schädlichen Folgen der Hyperoxie sein. In einem anderen Bereich gibt es einen solchen Therapieansatz bereits. Das Medikament Tocilizumab beispielsweise wird derzeit bereits bei Patienten mit rheumatoider Arthritis angewandt (Heinzl 2008). Dieses Medikament ist ein humanisierter Antikörper gegen IL-6. Durch die Blockierung des Interleukin-6 Rezeptors stoppt es die weitere Signalkaskade (Scheller et al. 2011).

In Zukunft wäre so eine Therapie von Neugeborenen mit Sauerstoff unter Zusatz eines vergleichbaren Medikaments ohne eventuelle Schäden im Gehirn idealerweise denkbar.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tierversuch Methoden

##### 3.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die tierexperimentellen Versuche sind nach den Richtlinien des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) (AZ8.87-51.04.2010.A372;84-02.04.

2015.A1) ausgeführt worden. Die für die Versuche verwendeten Wildtyp-Mäuse (C57BL/6N) und Knockout-Mäuse (B6.129S2-Il6(tm1Kopf/J)) wurden in der Universitätsklinik Köln gezüchtet und gehalten. Die Haltung fand in feuchtigkeits- und temperaturkontrollierten Räumen mit einem 12:12 hell-dunkel-Rhythmus statt. Zugang zu Futter und Wasser war ad libitum gegeben.

An Tag 1 nach der Geburt (P1) wurden die Mäuse gesammelt und randomisiert auf die Mütter verteilt. Eine Hälfte der Mäuse wurde bei 85% Sauerstoffsättigung gehalten (Hyperoxie Gruppen Kontrolle und IL6-Knockout). Die andere Hälfte wurde weiterhin bei 21% Sauerstoffsättigung gehalten (Normoxie Gruppen Kontrolle und IL6-Knockout).

Die Mütter wurden alle 24h zwischen Normoxie und Hyperoxie getauscht, um Schädigungen bei den Müttern zu vermeiden. Die Kammer für die Hyperoxie-Versuche war eine 90x42x38cm Plexiglas Kammer und wurden mit 3,5 l/min und 85% Sauerstoff belüftet. Der Sauerstoffgehalt wurde mit Hilfe eines Miniox II Monitors überprüft.

##### 3.1.2 Versuchsaufbau

Der Versuch wird in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

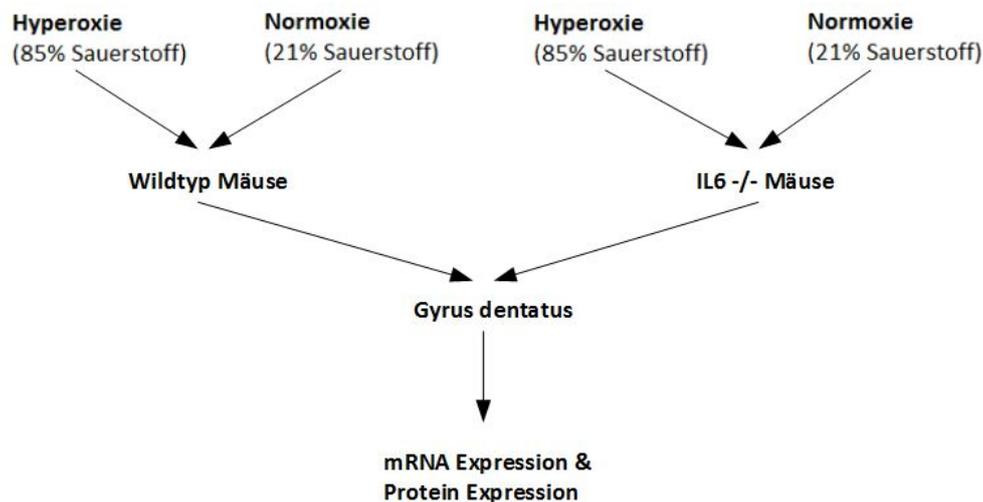


Abbildung 9: Aufbau des Tierversuchs

Während des Versuchs werden die Tiere entweder Hyperoxie (85% Sauerstoff) oder Normoxie (21% Sauerstoff) ausgesetzt. Um eventuelle Veränderungen durch einen IL6-Knockout (Abkürzung in der Abbildung IL6-/-) festzustellen, werden die Versuche jeweils mit Wildtyp-Mäusen und mit IL6-Knockout-Mäusen durchgeführt. Die Versuchsgruppen bestehen aus 22 Wildtyp-Mäusen und 35 IL6-Knockout-Mäusen. Allen Mäusen wird am postnatalen Tag 28 (Abkürzung in der Abbildung P28) der Gyrus dentatus zur weiteren Untersuchung entnommen. Der Gyrus dentatus wird auf Protein- und Genexpressionsebene untersucht

## 3.2 Zellkultur-Methoden

### 3.2.1 Zellen und Haltungsbedingungen

Die HT22-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Alex Methner, ehemaliger Oberarzt der Neurologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Die HT22-Zellen stammen aus dem Hippocampus der Maus und wurden nachträglich immortalisiert.

Als Medium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4.5 g/L D-Glucose, L-Glutamine und Pyruvat gemischt mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10 % fetales bovines Serum. Die Zellen wurden im Inkubator Heracell 150i von Thermo scientific bei 37 °C, 5% Kohlenstoffdioxid und 21% Sauerstoff inkubiert. Je nach Dichte der bewachsenen Zellkulturflasche wurden die Zellen alle 2-3 Tage passagiert.

Beim Passagieren wurde das Medium unter der Bench abgesaugt und die Flasche mit 30 °C warmen PBS abgespült. Das PBS wurde wiederum abgesaugt und die Zellen von der Flasche mittels Trypsin gelöst. Nachdem sich alle Zellen abgelöst hatten, wurde die Wirkung des Trypsins durch die Hinzugabe von Medium gestoppt, da das bovine Serum die Reaktion stoppt. Das Medium-Trypsin-Zell-Gemisch wurde in einem Falcon 3 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und das entstandene Pellet in neuem Medium gelöst. Je nach Zelldichte der alten Flasche wurden die Zellen in Verdünnungen von 1:10 bis 1:15 auf die neue Flasche mit neuem Medium aufgetragen.

### 3.2.2 Versuchsaufbau

Für den Zellkulturversuch wurde der in Abbildung 10 dargestellte Aufbau verwendet.

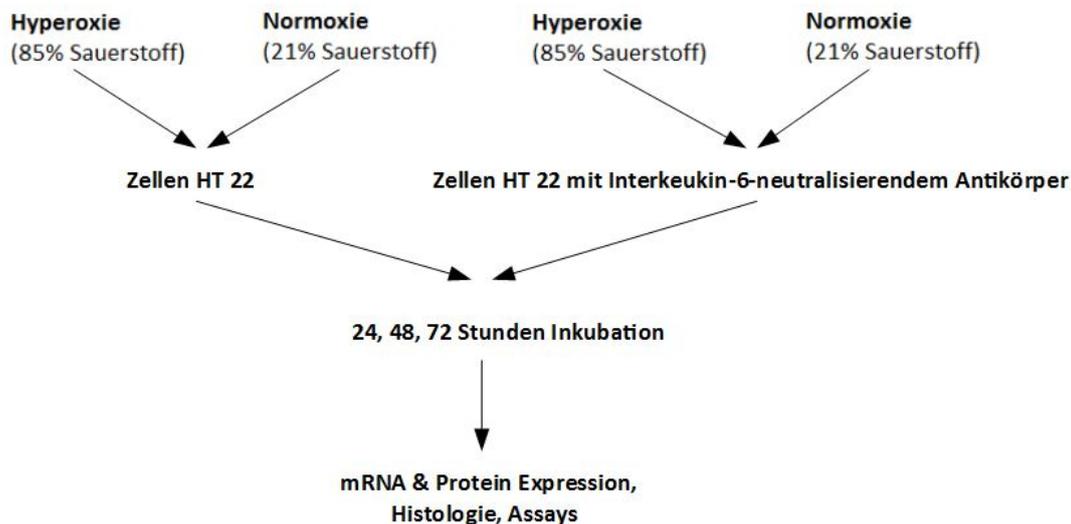


Abbildung 10: Aufbau des Zellkulturversuchs

Somit ergeben sich vier Versuchsgruppen: Normoxie Kontrolle, Normoxie mit Interleukin-6- neutralisierendem Antikörper (im Folgenden IL6-nAk), Hyperoxie Kontrolle und Hyperoxie mit IL6-nAk. Für die unterschiedlichen Zeitpunkte wurde eine unterschiedliche Zellkonzentration auf Zellplatten aufgetragen, um eine möglichst gleiche Zelldichte auf den Platten zu erreichen. Die verschiedenen Konzentrationen für RNA-/Proteingewinnung, Färbung und Assays sind in der folgenden Tabelle Nr. 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Zellkonzentrationen

	Zellkonzentration RNA-/ Proteingewinnung	Zellkonzentration Färbung	Zellkonzentration Assays
24 h Platten	19,12 * 10 <sup>5</sup>	0,6 * 10 <sup>5</sup>	0,0956 * 10 <sup>5</sup>
48 h Platten	9,56 * 10 <sup>5</sup>	0,3 * 10 <sup>5</sup>	0,048 * 10 <sup>5</sup>
72 h Platten	4,78 * 10 <sup>5</sup>	0,15 * 10 <sup>5</sup>	0,0239 * 10 <sup>5</sup>

Für die IL6-Neutralisierung wurde den beiden Gruppen 0,5mg/mL des neutralisierenden Antikörpers zu dem Medium hinzugegeben. In der Kontrollgruppe wurde 0,5 mg/mL PBS hinzugegeben. Die Gruppen unter Hyperoxie-Bedingungen lagerten in einem anderen Inkubator, der auf 37 °C 5% Kohlenstoffdioxid und 85% Sauerstoff eingestellt wurde.

Für eine statistische Auswertung der Versuche wurde jeder Versuch für Protein- und mRNA-Analyse vier Mal, die Assays als Doppelbestimmung je zwei Mal und die Färbungen mit mehreren Gesichtsfeldern einfach durchgeführt.

### 3.2.3 Ernten der Zellen

Zur Gewinnung der Zellen wurden, nach den verschiedenen Zeitpunkten, das restliche Medium abgesaugt und die Platten mit PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die Platten auf Trockeneis gelagert. Die Zellen wurden mittels eines Dispensers von der Platte abgeschabt und mit einer Pipette in ein Tube überführt. Anschließend wurde die Platte nochmals mit etwas PBS abgespült und auch diese Flüssigkeit in das Tube gegeben. Die Zelltubes wurden dann 5min bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde von dem Pellet abpipettiert und das Pellet bis zu weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

### 3.3 Geräte und Materialien

#### 3.3.1 Hard- und Software

Tabelle 2: Hard- und Software

Gerät/Material		Firma
Vortexer	Ika Vortex 1	Ika
Tischzentrifuge		Sprout
Pipetten 10,20,100,200,1000	Research plus	Eppendorf
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf
Waage		Precisa
PH-Messgerät	Lab 860	Schott Instruments
Elektrode		SI Analytics
Magnetrührer mit Heizplatte	VMS-A	VWR
Power Supply	Peqlab EV231/ 202	Peqlab
	Electrophoresis	
Semi-Dry Elektrobloetter	PerfectBlue	Peqlab
Thermozykler	7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems
(Programm: 7500 Software	Version 2.0.5	Applied Biosystems)
Homogenisator	Sonopuls SH 70G	Bandelin
Zentrifuge	Rotina 420R	Hettich Zentrifugen
Mikroskop	Olympus DP80, BX43	Olympus
(Programm: cellSens	cell Sens Dimension 1.12	Olympus)
Immunofloureszenzlampe	Olympus U-HGLGPS	Olympus
Absorptionsmessgerät	Nano Quant infinite M200 Pro	Tecan
(Programm: Tecan i-control	u.a. Version 3.7.3.0	Tecan)
Imager	MolecularImager ChemiDoc	Bio-Rad
	XRS+Imaging System	
(Programm: Image Lab	Version 5.2.1 build 11	Bio-Rad Laboratories)
Platte	NanoQuand plate	Tecan
Millipore-Wasser	Milli-Q Q-Pod	Millipore

### 3.3.2 Material Molekularbiologische Methoden

Tabelle 3: Molekularbiologische Methoden

Gerät/Material		Firma
Tri Reagent		Sigma
Trizol	TRizol Reagent	Ambion
Multipipette	Multipette plus	Eppendorf
Pipettenspitzen 5, 10 mL	Combitips advanced	Eppendorf
RNAsin	RNaseZap	Ambion
Gewebemühle	MM400	Retsch
Zentrifuge		Hermle
Vortexer	Bio Vortex C1	Kisker
2-Propanol	Rotipuran	Roth
Ethanol	Rotipuran	Roth
Ethanol (vergällt)		Roth
Trichlormethan/ Chloroform	Rotipuran	Roth
Absorptionsmessgerät (Programm: Tecan i-control	Nano Quant infinite M200 Pro u.a. Version 3.7.3.0	Tecan Tecan)
Platte	NanoQuand plate	Tecan
Blockthermostat		HLC
RQ1 DNase		Promega
RQ1 DNase Buffer		Promega
RQ1 DNase Stop Solution		Promega
M-MLV RT 5x		Promega
M-MLV RT		Promega
rRNasin		Promega
Random primer	0,5µg/ µL	Roche
Oligo-dT	0,5 µg/µL	MWG
10 mM dNTP Mix		Fermentas
Pipettenspitzen mit Filter	Biosphere Fil- Tip 10 farblos	Sarstedt
96- Well Platte	96- well semi-skirted PCR plate	4titude
Folie	QPCR Seal	4titude
Pipette 10,100,1000	Reference	Eppendorf
Wasser	Water for chromatography	Merck
SYBR	SYBR GreenER	Invitrogen
Platinum qPCR	SuperMix-UDG with ROX	Invitrogen

### 3.3.3 Material Proteinbiochemische Methoden

Tabelle 4: Proteinbiochemische Methoden

Gerät/Material		Firma
Inkubator	Shaker DTS-4	Sky Line ELM I
Absorptionsmessgerät (Programm: Tecan i-control Platte	Nano Quant infinite M200 Pro u.a. Version 3.7.3.0 NanoQuand plate	Tecan Tecan)
Zentrifuge	Centrifuge 5424R	Eppendorf
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	200mM in Isopropanol	Sigma
Protein-Kit	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
96-Well Platte	96F without Lid SH Microwell Plate	Thermo Scientific
10% APS		Sigma
Leupeptin 1mg/mL		Sigma
Aprotinin 5mg/mL	From bovine lung	Sigma
Sodiumorthovanadat 200mM		Sigma
PepstatinA 1,5mg/mL		Sigma
Sodium fluoride 200mM		Sigma
Methanol		Roth
Wasserbad		Memmert
Imager	MolecularImager ChemiDoc XRS+Imaging System	Bio-Rad
(Programm: Image Lab Folienschweißgerät	Version 5.2.1 build 11	Bio-Rad Laboratories)
Nitrozellulose Membran	Nitrocellulose Blotting Membrane Protran 0,45µm NC	Severin Amersham
Whatman Paper		Roth
Proteinmarker	Page Ruler	Fermentas
Doppelgel-Elektrophorese System	PerfectBlue Twin 45-1614	Peqlab
Ponceau	0,1% Ponceau S in 5% Essigsäure	Roth
Blockthermostat		HLC
Temed		Merck
Blot-Reagenz	ECL Prime Western Blotting DetectionReagent	Amersham
Taumel-Schüttler	Dumoax 1030	Heidolph
Tween 20		Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30	(37,5:1)	Roth
Albumin	Fraktion V	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	(ACS)	Roth

### 3.3.4 Material Zellkultur

Tabelle 5: Zellkultur

Gerät/Material		Firma
Interleukin 6 Antikörper	mouse Il-6 Antibody	R&D Systems
Analyse-Gerät	Glomax Multi Detection System	Promega
Zentrifuge	Centrifuge 5424R	Eppendorf
24-Well-Platte	TC-Platte 24 Well, Cell+, F	Sarstedt
Pipettenspitzen 10, 100	Biosphere Filter Tip 10 neutral	Sarstedt
Pipettenspitzen 1250	Safe seal surPhob Spitzen 1250	Biozym
Wasserbad		GFL
Mikroskop	Axiovert25	Zeiss
Bench		Tecniplast
Zentrifuge	Centrifuge 5804R	Eppendorf
Vortexer	Analog Vortex Mixer	VWR
Kühlschrank		Liebherr Economy
Inkubatoren	Heracell 150i	Thermo scientific
Saugflasche	HLC	Ditabis
Pipetten und Pipettierhilf	Easypet, Research plus 10, 100, 1000	Eppendorf
Multipipette	Research plus 10x100	Eppendorf
Haemacytometer	Profondeur 0,1mm	Roth/ Marienfeld
Deckgläser	13mm Durchmesser	VWR
Pasteurpipetten		Labsolute/Thgeyer
Stabpipette 5, 10, 25 ml		Sarstedt
Zellkultur-Flaschen 75, 175 cm <sup>2</sup>		Sarstedt
Zellschaber, 24cm		TPP
Cryo-Röhrchen 2ml		Sarstedt
PCR-Tubes 0,2 ml		PeqLab
Reaktionsgefäße und Falcons	0,5, 1,5, 2,0 ml und 15, 50 ml	Sarstedt
Autoklavierbeutel		Geyer
Sauerstoff		Linde
Absorptionsmessgerät (Programm: Tecan i-control	Nano Quant infinite M200 Pro u.a. Version 3.7.3.0	Tecan Tecan)
Platte	NanoQuand plate	Tecan
Medium	DMEM(1x) 4,5g/L D-Glucose, L-Glutamin, Pyruvat	Gibco
Waschpuffer	DPBS (1x) ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>	Gibco
Waschpuffer	PBS pH 7,4 (10x) ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>	Gibco
MTT Assay	MTT Cell Proliferation Assay	ATCC bioproducts
Caspase Assay	Caspase-Glo 3/7-Assay	Promega

Neurite outgrowth Assay	molecular probes	Life technologies
Poly-L-Lysin	Poly-L-Lysine 0,01%	sigma
FBS	FBS Superior	Biochrom
Trypsin	Trypsin- EDTA Solution	Sigma
Formaldehydlösung	Roti-Histofix 4%	Roth
Mikroplatte 96-Well	PS, F-Boden (Kaminform)	Greiner bio-one
Mikroplatte 96-Well	TC-Platte 96 Well StandardF	Sarstedt
P/S (Penicilin/Streptomycin)		Sigma

### 3.3.5 Material Histologie

Tabelle 6: Histologie

Geräte/Material		Firma
Formaldehydlösung	Roti-Histofix 4%	Roth
Schüttler	3005	GFL
Triton	10% Triton X100	Sigma
Mouting Medium DAPI	IS Mounting Medium DAPI	Dianaova
Wässriges Mounting Medium	FluoromountAqueous Mounting Medium	Sigma
Neo-Clear		Merck
Neo-Mount		Merck
Hämalaun	Sauer nach Mayer	Roth
Eosin	Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Roth
Ethanol vergällt		Roth
PBS	Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> 9,55g/L	Biochrom
Mikroplatte 24-Well	TissueCulture Plate 24-Well Flat Bottom Cell+	Sarstedt
Deckgläser	13mm Durchmesser	VWR
NGS (normal goat serum)		Jackson
Poly-L-Lysin	Poly-L-Lysine 0,01%	Sigma

### 3.3.6 Puffer, Stammlösungen und Chemikalien

Tabelle 7: Puffer und Stammlösungen

Material	
10x Towbin	0,25M Tris 2M Glycin Zum Blotten 20% Methanol in 1xPuffer
RIPA	50 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,4 mit HCl 1%NP-40 (Igepal) 2 mM EDTA
Modifizierter RIPA-Puffer	PMSF 1mM Leupeptin 1µg/ml in Aqua dest Aprotinin 1µg/ml in Aqua dest Pepstatin A 1µg/ml in Methanol Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1mM in Aqua dest NaF 1mM in Aqua dest
10x TBS	1M NaCl 0,1M Tris pH 7,5 mit HCl
TBST	1x TBS + 0,01 Tween 20
10x Lämmli (Laufpuffer)	0,25M Tris 2M Glycin 1% SDS
Trenngelpuffer	1,5M Tris pH 8,8 mit HCl
Sammelgelpuffer	0,5M Tris pH 6,8 mit HCl
Stripping Buffer	0,05M Tris pH 6,7 2% SDS Vor Gebrauch: 0,7%β-Mercaptoethanol
Probenpuffer 5x (50mL)	8,2ml Sammelgelpuffer 10,3ml 10% SDS 1,3ml Bromphenolblau 5ml Glycerin 12,5ml β-Mercaptoethanol
DEPC H <sub>2</sub> O	200µl DEPC auf 100mL Aqua bidest, autoklavieren

Antibody dilution Buffer	1x PBS 1% BSA 0,3% Triton X-100
Blocking Buffer	1x PBS 5% NGS (normal goat serum)
Blocking WB	5% Milch 2% BSA in TBST
Antibody dilution Buffer WB	5% Milch in TBST oder 5% BSA in TBST

Tabelle 8: Chemikalien

Material		Firma
Glycin	Pufferan	Roth
TRIS	Ultra Qualität Pufferan	Roth
DEPC	BioChemics	AppliChem
EDTA		Sigma
SDS	Blotting-Grade	Roth
Natriumchlorid		Roth
NP-40		Calbiochem
PonceauS		Roth
Milchpulver	Blotting grade, fettarm	Roth
2-Mercaptoethanol		Roth
Natriumorthovanadat		Sigma
Natriumfluorid		Sigma
Salzsäure		Merck

### 3.3.7 Oligonukleotide

Tabelle 9: Oligonukleotide

Primer	Orientierung	Sequenz (5'-3')	Firma
GAPDH	forward	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA	MWG Eurofins
	reverse	TGCCTGCTTCACCACCTTCT	
IL6	Taq	CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	MWG Eurofins
	forward	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT	
	reverse	AATCAGAATTGCCATTGCACAA	
IL6 neu	Taq	TCTTTTCTCATTTCACGATTTCCAGAGAA	MWG Eurofins
	forward	ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGA	
	reverse	CACTCCTTCTGTGACTCCAGCTTA	
IL1 beta	Taq	AGTCCTTCCTACCCCAATTTCCAATGCTC	MWG Eurofins
	forward	TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC	
	reverse	GGACAGCCCAGGTCAAAGG	
TNF alpha	forward	GGCTGCCCCGACTACGT	MWG Eurofins
	reverse	GACTTTCTCCTGGTATGAGATAGCAA	
	Taq	CCTCACCCACACCGTCAGCCG	
MCP 1	forward	GGCTCAGCCAGATGCAGTTAAC	MWG Eurofins
	reverse	CTTGGTGACAAAACCTACAGCTTCTT	
	Taq	CCCCACTCACCTGCTGCTACTCATTCA	
TGF beta	forward	CCCCACTCACCTGCTGCTACTCATTCA	MWG Eurofins
	reverse	CACGTGGAGTTTGTATCTTTGCT	
	Taq	CTTTCGATTACAGCGCTCACTGCTCTTG	
CTGF	forward	CATTAAGAAGGGCAAAAAGTGCAT	MWG Eurofins
	reverse	TGCAGCCAGAAAGCTCAAACCT	
	Taq	CGGACACCTAAAATCGCCAAGCCTG	
BDNF	forward	CACATTACCTTCTGCATCTGTTG	MWG Eurofins
	reverse	TAAGGAAAAGGATGGTCATCACTCT	
	Taq	CAGCAAAGCCACAATGTTCCACCAGG	
GDNF	forward	CCAGTGACTCCAATATGCCTGAA	MWG Eurofins
	reverse	CCTGCCGATTCTCTCTCTTC	
	Taq	CACCAGATAAACAAGCGGCAGCGC	
CNTF	forward	AAGGTGACTTCCATCAGGCAAT	MWG Eurofins
	reverse	CGCCATTAACCTCTAGCTGGTA	
	Taq	TACTCTTACGCTCCAAGTTTCTGCCTTCGC	
VEGF	forward	AGAAGTCCCATGAAGTGATCAAGTT	MWG Eurofins
	reverse	CACAGGACGGCTTGAAGATGT	
	Taq	TACCAGCGAAGCTACTGCCGTCCGAT	

PCNA	forward	GGAGGCGGTAACCATAGAGATG	MWG Eurofins
	reverse	ACAGTGGAGTGGCTTTTGTGAA	
	Taq	ATGAGCCTGTTACCTAACGTTTGCTCTGA	
p21	forward	GAACATCTCAGGGCCGAAAA	MWG Eurofins
	reverse	CGTGGGCACTTCAGGGTTT	
	Taq	CAGACCAGCCTGACAGATTTCTACTCCA	
Bax	forward	TGCTGATGGCAACTTCAACTG	MWG Eurofins
	reverse	TTTAGTGCACAGGGCCTTGAG	
	Taq	CCGCGTGGTTGCCCTTTCTACTTTG	
BCL2	forward	GCATCACTCTGGGTGCATACC	MWG Eurofins
	reverse	GCTTTAGTGAACCTTTTGCATATTTG	
	Taq	CCACAAGTGAGGTCGACAAACCTGCC	
cfos	forward	ATCCGAAGGGAACGGAATAAG	MWG Eurofins
	reverse	CAACGCAGACTTCTCATCTTCAA	
	Taq	AGCTGACAGATACTCCAAGCGGAGACA	

### 3.3.8 Antikörper

Tabelle 10: Antikörperliste

Antikörper	Größe	Verdünnung	2. Antikörper-Verdünnung	Firma und Nummer
Rabbit-Anti SOCS 3	26 kDa	1:1000 in BSA	1:1000	Cell signaling #2923
Mouse-Anti STAT 3	79,86 kDa	1:3000 in Milch	1:3000	Cell signaling 124H6 #9139
Rabbit-Anti pSTAT 3	79,86 kDa	1:1000 in BSA	1:1000	Cell signaling Tyr705 D3A7 #9145
Rabbit-Anti GFAP	50 kDa	1:1000 in BSA	1:1000	Abcam ab48050
Rabbit-Anti Iba 1	17 kDa	1:1000 in BSA	1:1000	Wako #016-20001
Rabbit-Anti Doublecortin	45 kDa	1:1000 in BSA	1:1000	Cell signaling #4604
Rabbit-Anti Erk	42,44 kDa	1:2000 in BSA Zellkultur	1:2000	Cell signaling #9102
Rabbit-Anti pErk	42,44 kDa	1:1000 in BSA Zellkultur 1:500 in BSA	1:1000	Cell signaling Thr202/Tyr 204 D13.14.4E XP #4370
Rabbit-Anti Akt	60 kDa	1:2000 in BSA	1:2000	Cell signaling #9272
Rabbit-Anti pAkt	60 kDa	1:1000 in BSA Zellkultur 1:500 in BSA	1:1000	Cell signaling Ser473 193H12 #4058
Rabbit-Anti pCAMKII	50,60 kDa	1:1000 in BSA	1:1000	Cell signaling Thr286 D21E4 #12716
Rabbit-Anti Synapsin	77 kDa	1:1000 in BSA	1:1000	Cell signaling D13C1 #6710
Rabbit-Anti pSynapsin	77 kDa	1:1000 in BSA	1:1000	Cell signaling Ser9#2311
Rabbit-Anti GAP43	38,43 kDa	1:2000 in BSA	1:2000	Cell signaling D9C8#8945
Rabbit-Anti GAPDH	37 kDa	1:4000 in BSA Zellkultur 1:1000 in BSA	1:4000 Zellkultur 1:2000	Cell signaling 14C10#2118
Anti rabbit				Cell signaling #2923
Anti mouse				Cell signaling #2923

## 3.4 Molekularbiologische Methoden

### 3.4.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation aus dem Gyrus dentatus wird zuerst 0,5mL TriReagenz auf das Gewebe gegeben. Mit Hilfe einer vorher hinzugefügten Kugel wird das Gewebe in der Gewebemühle 20 sec bei 30Hz homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 5min auf Raumtemperatur werden 100 $\mu$ L Chloroform hinzugegeben, um die RNA von den restlichen Bestandteilen wie DNA und Protein abzutrennen. Das Tube wird gemischt und 2 bis 3 min auf Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird es bei 12000 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand, der die RNA enthält, in ein neues Tube überführt. Auf den Überstand werden 250 $\mu$ L Isopropanol gegeben um RNA auszufällen. Nachdem alles durchmischt wurde, wird das Tube 20 min auf Eis ( 4°C ) gestellt. Anschließend wird es 15 min bei 15000 U/min und 4°C zentrifugiert und das Isopropanol abgekippt. Nach diesem Schritt ist bereits das RNA-Pellet erkennbar.

Es folgen zwei Waschschrte, bei denen 0,5 mL 75 % Ethanol in das Tube gegeben werden und es nach dem Mischen 5min bei 15000 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt wird. Im Anschluss lässt man das Pellet 30 min bei Raumtemperatur trocknen und löst es danach in Aqua bidest RNase frei (DEPC-Wasser). Mit Hilfe des Tecan NanoQuant infinite M200 Pro und der Software icontrol wird dann eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Hierzu wird jeweils 2  $\mu$ L DEPC-Wasser auf in die Messform gegeben, um einen Nullwert vorzugeben (blanken). Danach werden 2  $\mu$ L der Probe in die Messform gegeben und die Konzentration der RNA bestimmt.

Bei einer Konzentration über 1000 ng/ $\mu$ L wird die Probe weiter verdünnt. Im Anschluss wird die RNA bei -80°C gelagert.

### 3.4.2 Umschreiben in cDNA

Die RNA besitzt die Eigenschaft sehr instabil zu sein, sodass zur weiteren Analyse die RNA in die stabilere cDNA umgeschrieben wird. Dazu wird die RNA je nach Konzentration mit DEPC Aqua dest. versetzt, sodass alle Proben die gleiche Konzentration an RNA im gleichen Volumen enthalten. Als ersten Schritt wird 10x DNase I-Puffer und RNase-free DNase I gemischt und je 8  $\mu$ L auf die RNA gegeben und 15 min auf Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, eventuell verbliebene DNA in den Proben zu verdauen. Anschließend gibt man 4  $\mu$ L 25mM EDTA (Stop-Solution) auf die Probe und erhitzt sie 15 min auf 65°C um die DNase zu denaturieren. Im Anschluss gibt man 20  $\mu$ L eines Mastermixes, bestehend aus Randomprimern (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L) und Oligo dt-Primern (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L) gelöst in DEPC Aqua dest., auf die Proben und stellt sie 5min auf 70°C . In diesem Schritt binden die Primer an die RNA, sodass die Reverse Transkriptase im nächsten Schritt einen Anfangspunkt hat. Bevor der zweite Mastermix, bestehend aus MMLV-buffer x5, dNTP-Mix (jeweils 10 mM), RNase-Inhibitor (40 U/ $\mu$ L), MMLV (Reverse Transkriptase 200 U/ $\mu$ L) in DEPC Aqua dest., auf die Probe gegeben wird, stellt man die Proben 1min auf Eis, damit die Enzyme des nächsten Schrittes nicht direkt denaturieren. Nun werden 40  $\mu$ L des zweiten Mastermixes auf die Probe gegeben und eine Stunde auf 37°C gestellt. In dieser Stunde lagert die Reverse Transkriptase die dNTPs an die Primer an und stellt somit einen komplementären Strang zur RNA her. Anschließend wird die cDNA bei -20°C eingefroren.

### 3.4.3 Grundlagen Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) dient zur Vervielfältigung der DNA. Für die PCR wird eine Taq-DNA-Polymerase, DNA und 2 spezifische Primer (vorwärts und rückwärts), Puffer und Nucleotide benötigt. Diese Bestandteile werden zusammen in ein Tube gegeben und in die PCR-Maschine gestellt.

Im ersten Schritt (Denaturierungsschritt) erhitzt die Maschine die Probe auf 94°C sodass sich die Doppelstränge der DNA auftrennen. Im zweiten Schritt (Annealingschritt) kühlt die Maschine auf 55°C ab. Bei dieser Temperatur lagern die spezifischen Primer sich an die DNA an. Im dritten Schritt (Elongationsschritt) erhitzt sich die Maschine auf 72°C. Bei dieser Temperatur arbeitet die Taq-DNA-Polymerase in ihrem Optimum und verlängert die Primer entlang des angelagerten DNA-Einzelstrangs. Da die DNA-Polymerase nur in 5'-3' Richtung Nucleotide anlagern kann, werden ein Vorwärts- und ein Rückwärts-Primer für die Einzelstrang-DNA benötigt. Nach den drei vorbeschriebenen Schritten hat sich die Anzahl der DNA verdoppelt. Die PCR kann nun in unterschiedlich vielen Zyklen gefahren werden, sodass die gewünschte Anzahl an DNA entsteht. Allerdings flacht die Kurve an DNA-Menge nach einiger Zeit ab, da weniger Primer und Nucleotide vorhanden sind und sich Pyrophosphat und defekte Nucleotide anreichern, die die Reaktion stören (Mülhardt 2009, S. 84 ff.).

Bei der Real-Time PCR ist die Besonderheit, dass man den Verlauf der PCR in Echtzeit beobachten kann und dieser in einem Graphen dargestellt wird.

Bei der TaqMan-PCR befinden sich die beiden Fluorochrome Reporter und Quencher auf einem Oligonucleotid. Beim Bestrahlen der Fluorochrome mit Licht einer Wellenlänge werden diese angeregt und strahlen das Licht mit einer anderen Wellenlänge ab. Wenn die zwei Fluorochrome eng genug beieinander liegen, wird die Energie von Fluorochrom Nr.1 direkt an das Fluorochrom Nr.2 weitergeleitet und dann von diesem in einer anderen Wellenlänge abgestrahlt. Daher nennt man das Fluorochrom Nr. 1 Reporter und das Fluorochrom Nr. 2 Quencher. Diese Methode nennt sich FRET (fluorescence resonance energy transfer). Bei der Taqman lagert sich nun das Oligonucleotid an den DNA-Einzelstrang an. Wenn das Oligonucleotid eingebaut wird, wird der Reporter freigesetzt und gibt die Energie in Form einer Wellenlänge ab. Umso mehr DNA jetzt synthetisiert wird, je höher ist die Signalstärke der spezifischen Wellenlänge (Mülhardt 2009, S. 109 ff.).

Bei der SYBR-Green PCR lagert sich der Farbstoff SYBR-Green I in die Doppelstrang-DNA ein. Desto mehr DNA synthetisiert wurde, umso höher ist die Signalstärke des SYBR-Greens (Mülhardt 2009, S. 109 ff., Monis, Giglio & Saint 2005).

Allerdings muss bei dieser Methode noch zwischen korrekt synthetisierten Strängen und Fehlsynthesen unterschieden werden. Dies wird anhand einer Schmelzkurve überprüft. Bei einem gemeinsamen Peak aller Proben wird von korrekten Synthesen ausgegangen, bei mehreren großen Peaks ist die Anzahl der Fehlsynthesen für eine korrekte Auswertung zu hoch (Mülhardt 2009, S. 109 ff.).

Die Auswertung findet anhand des Reaktionsgraphen statt. Hierbei muss ein Punkt gewählt werden, bei dem die DNA-Syntheseanzahl noch exponentiell zunimmt (CT-Wert). Durch die Anfertigung einer Standardkurve kann man dann von dem CT-Wert auf die ursprüngliche Probemenge zurückschließen, die die Expression des Gens im Organismus bzw. in der Zelle angibt (Mülhardt 2009, S. 109 ff.).

#### 3.4.4 TaqMan real-time PCR

Für die TaqMan real-time PCR von der Firma Invitrogen wird der Primer taq auf 2  $\mu\text{M}$  und die Primer forward und reverse auf 6  $\mu\text{M}$  in HPLC-Wasser verdünnt.

Als erstes wird der Mastermix hergestellt. Hierfür werden bei 56 Proben, zuzüglich der Negativprobe und Reserve, 800  $\mu\text{L}$  von dem Platinum Supermix benötigt. In dem Platinum Supermix befindet sich die Taq-Polymerase, thermostabile Polymerase, Nukleotide und Stabilisatoren.

Diesen Supermix verdünnt man mit 544  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser und gibt jeweils 32  $\mu\text{L}$  der Primer taq, forward und reverse hinzu.

In einer 96-Well-Platte wird nun in jedes Well 22,5  $\mu\text{L}$  des Mastermixes gegeben und jeweils 2,5  $\mu\text{L}$  der cDNA. In das letzte Well wird statt der cDNA 2,5  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser hinzugefügt. Anschließend wird die Platte mit einer Folie verschlossen, um ein Verdunsten der Proben zu verhindern.

Nach diesem Schritt wird die Platte bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert, damit sich der Mastermix und die Probe im unteren Teil des Wells befinden und in das 7500 Real Time PCR System zur Analyse gestellt.

#### 3.4.5 SYBR-Green real-time PCR

Bei der SYBR-Green real-time PCR von der Firma Invitrogen werden die Primer forward und reverse auf 10  $\mu\text{M}$  in HPLC-Wasser verdünnt. Für den Mastermix werden 800  $\mu\text{L}$  des SYBR-Supermixes, welcher SYBR-Green I, Taq DNA-Polymerasen und Nukleotide enthält, mit 352  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser verdünnt. Zusätzlich werden jeweils 32  $\mu\text{L}$  der Primer forward und reverse hinzugegeben. Von dem Supermix werden nun pro Well 19  $\mu\text{L}$  in die 96-Well-Platte pipettiert und jeweils 1  $\mu\text{L}$  der cDNA zuzüglich der Negativprobe mit 1  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser statt cDNA.

Die Platte wird ebenfalls mit einer Folie verschlossen, bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert und in das 7500 Real Time PCR System zur Analyse gestellt.

#### 3.4.6 Unterschiede bei den Zellkultur-Versuchen

Bei den Zellkulturversuchen wurde ein leicht verändertes Protokoll genutzt. Größtenteils laufen die molekularbiologischen Methoden allerdings wie bei Gewebeproben, siehe Kapitel 3.3, ab.

Folgend möchte ich nur die Unterschiede darstellen: Bei der RNA-Isolation wird im ersten Schritt, 0,5mL Tri Reagent auf die Zellen gegeben und mit der Pipette die Zellen mit dem Tri Reagent vermischt, dann folgt direkt die 5 minütige Inkubationszeit. Durch das Vermischen der Zellen mit der Pipette und keiner festen Gewebestruktur werden die Zellen genug zerkleinert, sodass sie nicht homogenisiert werden müssen. Anschließend läuft das Protokoll wie bereits beschrieben ab. Am Schluss wurde bei der Verdünnung der Pellets weniger DEPC-Wasser gebraucht, um auf eine ideale Verdünnung zu kommen.

Bei dem Umschreiben in cDNA wurden weniger RNA verwendet, sodass weniger Ansätze umgeschrieben wurden. Der Rest der cDNA-Synthese, sowie die real-time PCR liefen gleich ab.

## 3.5 Proteinbiochemische Methoden

### 3.5.1 Protein-Isolation

Für die Protein-Isolation der Tierversuche wird zuerst ein modifizierter RIPA-Puffer, bestehend aus 5mL unmodifiziertem RIPA-Puffer, 1  $\mu\text{L}$  Aprotinin, 3,35  $\mu\text{L}$  Pepastatin A, 5  $\mu\text{L}$  Leupeptin, 25  $\mu\text{L}$  PMSF, 25  $\mu\text{L}$  NaF und 25  $\mu\text{L}$   $\text{Na}^3\text{VO}^4$  (siehe Tabelle 7) hergestellt.

Auf die Gewebestücke werden nun jeweils 100  $\mu\text{L}$  modifizierter RIPA-Puffer gegeben und das Gewebe mittels eines Mini-Mörsers zerkleinert. Anschließend wird das Restgewebe 20 sec sonifiziert, um die restlichen Gewebestücke zu zerkleinern.

Nach einer einstündigen Inkubationszeit auf Eis wird das Protein-Gemisch 5 Minuten lang bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugiert.

Das Proteingemisch entspricht dem entstehendem Überstand. Dieser wird nun abpipettiert und bei -80°C eingefroren.

### 3.5.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteine wird ein Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwendet.

Zunächst verdünnt man die Probe 1:10 mit modifiziertem RIPA-Puffer. Danach wird eine Standardreihe mit verschiedenen Konzentrationen von modifiziertem RIPA-Puffer und Albumin als Vergleichslösung hergestellt. In eine ELISA-Platte wird nun die Standardreihe pipettiert, in weitere Wells jeweils 10  $\mu\text{L}$  Probe und in alle Wells zusätzlich 200  $\mu\text{L}$  des Working-Reagent des BCA-Kits. Jede Bestimmung wird doppelt durchgeführt, um z.B. Pipettierfehler zu minimieren.

Die ELISA-Platte wird 30 min bei 37°C inkubiert und im Absorptionmessgerät Nano Quant infinite M200 Pro von Tecan bei 562 nm gemessen.

Mit der Messung kann nun ermittelt werden, wie viel Mikrogramm Protein pro Mikroliter Probe enthalten ist um so für den WesternBlot die gleiche Proteinmenge für jede Probe aufzutragen.

## Grundlagen Western-Blot

Durch die Gelelektrophorese können Proteine analysiert werden.

Für die folgenden Versuche wurde die Western-Blot Variante der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die zu untersuchenden Proteine bilden mit dem Natriumlaurylsulfat (SDS) einen negativ geladenen Komplex, der eine reine Unterscheidung anhand der Größe der Proteine später im Gel ermöglicht. Zudem denaturiert das SDS gemeinsam mit dem  $\beta$ -Mercaptoethanol die Proteine und verhindert durch ein Unterbinden der Disulfidbrücken das Ausbilden einer Quartärstruktur. In der Elektrophorese wird das Gestell an Strom angeschlossen, sodass sich die negativ geladenen Komplexe zum Plus-Pol bewegen. Dies geschieht durch ein Lämmli-System mit einem Sammel- und Trenngel (Rehm 2010.).

In das Sammelgel werden die Proben aufgetragen und im Trenngel findet die Auftrennung der Proteine je nach Größe statt. Kleine Proteine wandern besser durch das Trenngel und sind daher weiter am Plus-Pol als größere Proteine (Rehm 2010).

Nach der Gelelektrophorese werden die Proteine von dem Gel auf eine Membran elektrophoretisch übertragen. Dadurch können die Proteine mit Antikörpern weiter analysiert werden. Die hier verwendeten Nitrocellulose-Membranen binden die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen (Rehm 2010).

Die Membran und das Gel werden nach folgenden Abbildung (Abbildung Nr. 11) in die Blotting-Kammer gelegt.

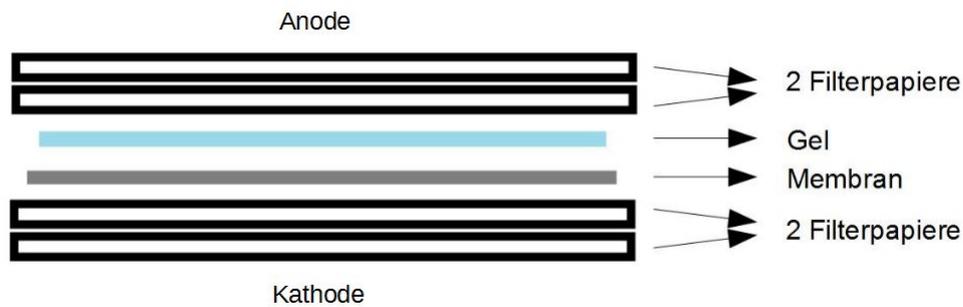


Abbildung 11: Aufbau Blotting

Nach dem Übertragen der Proteine auf die Membran wird eine Probefärbung mit Ponceaurot durchgeführt. Ponceaurot bindet an die Proteine und färbt sie so sichtbar rot, sodass eine erste Qualitätskontrolle durchgeführt werden kann. Nun werden unspezifische Antikörperbindungsstellen mithilfe von 5% Milch und 2% BSA in TBST geblockt. Die Antikörperbindung ist in Abbildung 12 dargestellt.

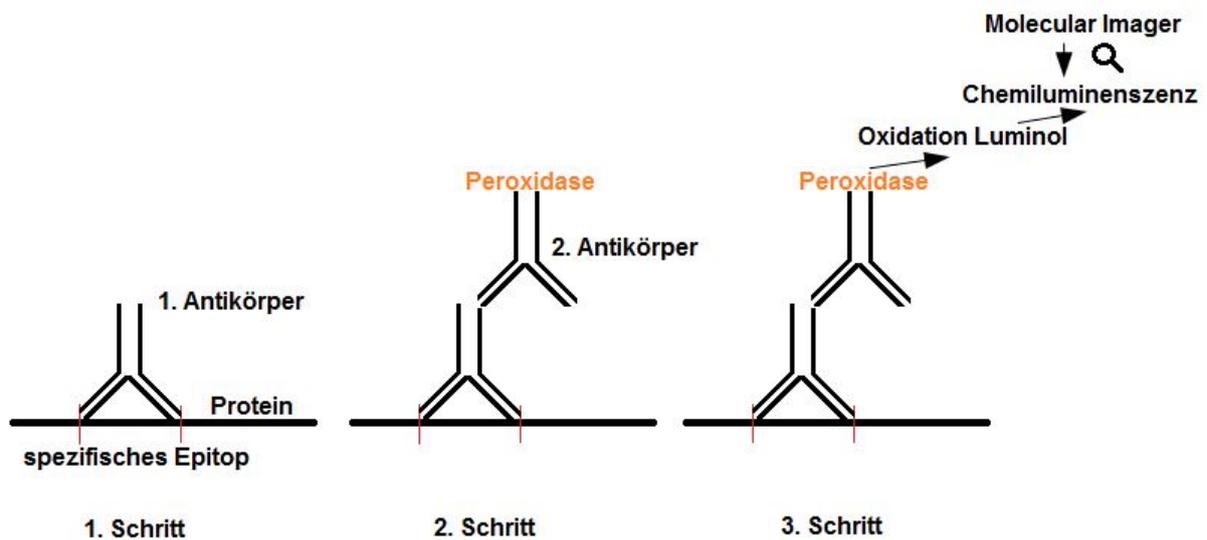


Abbildung 12: Funktionsweise Antikörper

Der Erstantikörper bindet sein Antigen auf dem Protein. Nach einem Waschschrift wird der Zweitantikörper aufgetragen. Dieser bindet an den Erstantikörper und ist auf das Herstellungstier spezifisch abgestimmt. Erstantikörper aus der Maus werden mit einem Anti-Maus Zweitantikörper versehen. Der Zweitantikörper ist zudem mit Peroxidase versehen, die in der ECL-Reaktion zu Luminol oxidiert. Diese Oxidation führt eine Chemilumineszenz herbei, die von einem Molecular Imager aufgenommen werden kann (Rehm 2010).

Durch  $\beta$ -Mercaptoethanol können die Bindungen der Antikörper an die Proteine, welche durch Disulfidbrücken gebunden sind, wieder gelöst werden, sodass die Membran mehrfach mit Antikörpern analysiert werden kann (Rehm 2010).

### 3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zuerst wird das Gel für die Gelelektrophorese in den dafür vorgesehenen Halter gegossen und mit einem Kamm, der 24 Taschen für die Proben hinterlässt, versehen. Die Gelzusammensetzung richtet sich nach der Größe der zu messenden Proteine und wird für jeden Versuch individuell angepasst. Für die folgenden Versuche wurden Laufgelkonzentrationen von 8, 10 oder 12 % und eine standardmäßige Konzentration des Sammelgels von 4 % verwendet. Nachdem das Gel polymerisiert ist, werden die Proteinproben vorbereitet. Die Proteinproben werden je nach ihrer Konzentration mit unterschiedlich viel destilliertem Wasser aufgefüllt, sodass sich bei allen Proben eine gleiche Konzentration und ein gleiches Endvolumen von  $10\mu\text{L}$  ergibt. Es werden zudem  $2,5\mu\text{L}$  eines 5-fach konzentrierten Probenpuffers hinzupipettiert. Dieser enthält SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol. Anschließend werden die Proben zur weiteren Denaturierung 10 Minuten auf  $70^\circ\text{C}$  erhitzt.

Das Gel wird in dem Halter nun in die dafür vorgesehene Halterung eingeklemmt und bis zum Füllstrich mit Lämmli-Puffer gefüllt. Die verwendete Zusammensetzung des Lämmli-Puffers ist Tabelle 6 (3.3.6) zu entnehmen. Anschließend werden die Kämmen entfernt und die Proben in die Taschen pipettiert. Zudem werden zwei weitere Taschen mit einem Marker "Page-Ruler Prest" befüllt. Dieser hat eine bekannte Proteinzusammensetzung, sodass von ihm auf die Größe der enthaltenen Proteine in den Proben geschlossen werden kann. Schließlich wird der Deckel auf die Halterung gesteckt und die Halterung mit dem Stromgenerator verbunden. Dieser wird auf 80 V eingestellt. Sobald die Proben sich im Trenngel befinden, kann die Stromspannung auf 120 V erhöht werden.

Nachfolgend wird der Transferpuffer für das Blotting vorbereitet. Hierzu benötigt man 20 mL 10 x Towbin-Puffer, 20 mL Methanol und 160 mL Aqua dest. Wenn die Proteine sich weit genug aufgetrennt haben, wird das Gerät ausgeschaltet und die Halterung auseinandergebaut. Das Gel wird nun in die Blotting-Kammer auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt, von in Transferpuffer getränkten Filterpapieren umschlossen und mit dem Transferpuffer nochmals übergossen. Die Kammer wird nun verschlossen und an den Stromgenerator angeschlossen. Dieser wird für 2 Stunden auf  $1,3\text{ mA/cm}^2$  eingestellt.

Nach den 2 Stunden wird eine Probefärbung mit Ponceaurot durchgeführt. Hierbei färbt man die Membran 2 min in Ponceaurot (0,2% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure) auf dem Taumel-Schüttler und spült die überschüssige Farbe mit Aqua dest. weg. Das Ponceaurot bindet an die Proteine und macht somit die Banden sichtbar. So kann man eine Qualitätskontrolle des Western-Blots durchführen. Die Banden sollten in den verschiedenen Proben alle jeweils auf einer Höhe und gleich stark gefärbt sein. Dann ist das Gel gleichmäßig beladen. Wenn dies der Fall ist, wird die Membran 45 min in 5% Milch, 2% BSA in TBST auf dem Schüttler blockiert. Hierbei werden alle Bindungsstellen besetzt und die spezifischen Bindungsstellen im Anschluss vom Antikörper verdrängt. Somit bleiben alle unspezifischen Bindungsstellen geblockt. Die Antikörper werden nun in 5% Milch in TBST oder 5% BSA in TBST, je nach Herstellerangabe, verdünnt. Der Antikörper wird nun mit dem jeweiligen Teil der Membran, auf dem das jeweilige spezifische Protein liegt, verschweißt und für 30 min auf Raumtemperatur und anschließend über Nacht auf  $4^\circ\text{C}$  auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Membranteile mit Antikörper noch einmal für 15 min auf Raumtemperatur inkubiert. Dann wird der Antikörper entfernt und die Membranteile werden in TBST gewaschen. Nach dem Waschen

schritt wird der Zweitantikörper in 5% Milch in TBST verdünnt, in einer Folie mit der Membran verschweißt und für eine Stunde auf Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Membran erneut mit TBST gewaschen und mit Hilfe von ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, dem Molecular Imager ChemiDoc XRS+ von Bio Rad und dem Programm Image-Lab aufgenommen.

Im Stripping-Schritt wird der Erstantikörper von der Membran mit Hilfe von  $\beta$ -Mercaptoethanol getrennt und, nach erneutem Blocken mit 5% Milch, 2% BSA in TBST, ein neuer Antikörper auf die Membran aufgebracht.

#### **3.5.4 Unterschiede bei den Zellkultur-Versuchen**

Bei den Zellkulturversuchen wurden im Vergleich zum bisher beschriebenen Protokoll bei der Proteinisolation weniger RIPA-Puffer verwendet. Für die Hyperoxie-Zellen wurden 25  $\mu\text{L}$ , für die Normoxie-Zellen 60  $\mu\text{L}$  RIPA-Puffer hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch nur durch Hoch- und Herunterpipettieren durchmischt. Die Schritte des Zerkleinerns mit Hilfe eines Mörsers und das Sonifizieren sind für Zellen nicht notwendig. Auch bei der Proteinbestimmung mit Hilfe des BCA-Kits wurde eine geringere Menge genutzt. Die Normoxie-Zellen wurden mit 30  $\mu\text{L}$ , die Hyperoxie-Zellen mit 24  $\mu\text{L}$  Endvolumen vorbereitet (Normoxie 27  $\mu\text{L}$  RIPA, Hyperoxie 20  $\mu\text{L}$  RIPA). Bei dem Westerblot wurde die Verdünnung der Antikörper angepasst (siehe Antikörpertabelle 3.4.).

### 3.6 Zellkultur Färbung

Für die Fluoreszenzfärbungen der HT22-Zellen wurden TC-Platten mit 24 Wells genutzt. In die Wells wurden Deckgläser gelegt. Nach dem Sterilisieren unter der UV-Lampe wurden die Deckgläser mit 73  $\mu\text{L}$  Poly-D-Lysin (0,01%) pro Well beschichtet. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde das Poly-D-Lysin abgesaugt und mit sterilem Aqua dest. abgespült. Dies wurde ebenfalls abgesaugt und die Platten 2 Stunden zum Trocknen gestellt. In Vorversuchen wurde die optimale Konzentration an HT22-Zellen für die Wells ermittelt, sodass nach 24, 48 und 72 Stunden ausreichend viele Zellen auf den Deckgläsern gewachsen sind. Die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 1 (3.2.2) dargestellt. Die Zellen wurden in 500  $\mu\text{L}$  + 0,25  $\mu\text{L}$  IL6nAk oder PBS je nach Gruppe inkubiert. Der Versuch wurde wie in 3.2.2 beschrieben in vier Gruppen (Normoxie IL6nAk, Normoxie Kontrolle, Hyperoxie IL6nAk und Hyperoxie Kontrolle) unterteilt.

Die entsprechenden Zellkonzentrationen wurden auf die Deckgläser aufgetragen und nach den jeweiligen Zeiten mit PBS gespült und mit 4% PFA fixiert. Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurde das PFA abgesaugt und mit PBS gespült. Bis zur Färbung wurden die Platten luftdicht verschlossen und in PBS im Kühlraum bei 4°C gelagert.

Für die Färbung wurden die Wells 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend mit PBS gespült. Als erster Schritt der Färbung wurden unspezifische Bindungen mit 200  $\mu\text{L}$  des Blocking Buffer, bestehend aus PBS und 5% Normal Goat Serum, für 30 Minuten geblockt. Anschließend wurde der primäre Antikörper Synapsin (Verdünnung 1:250) und für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Spülen mit PBS wurde der Zweitantikörper Anti-rabbit (Verdünnung 1:500) aufgetragen und 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Deckgläser wurden anschließend mit PBS gespült und mit wässrigem Mountingmedium mit DAPI-Färbung eingebettet. Bis zum Mikroskopieren wurden die Objektträger auf Grund der Lichtempfindlichkeit der Farbstoffe im Dunkeln und bei 4°C gelagert.

Beim Mikroskopieren wurde die Fluoreszenzlampe auf 50% gestellt. Bei Synapsin wurde eine Belichtungszeit für Cy3 von 300 ms und für DAPI 3 ms festgelegt. Es wurden bei Synapsin 10 Gesichtspunkte mit einem 100er Objektiv aufgenommen und anschließend ausgewertet, um eine statistische Beurteilung vornehmen zu können.

## 3.7 Assays

### 3.7.1 MTT-Assay

Mit Hilfe des MTT-Assays sollte das Proliferationsverhalten der HT22-Zellen unter den verschiedenen Umständen untersucht werden. Folgende vier Gruppen wurden miteinander verglichen:

- Normoxie Kontrolle,
- Normoxie IL6-neutralisierender-Antikörper,
- Hyperoxie Kontrolle und
- Hyperoxie IL6-neutralisierender-Antikörper.

Zusätzlich wurden die vier Gruppen in verschiedenen Zeitpunkten (24,48,72h) miteinander verglichen, um die Entwicklung über die Zeit mit einfließen zu lassen.

Der Konzentrationsfaktor wurde entsprechend zu den Konzentrationen der Färbungen gewählt und auf die kleinere Größe der Wells angepasst. Für die Assays wurde eine TC-Platte mit 96 Wells genutzt. Die verwendeten Konzentrationen sind Tabelle 1 (3.2.2) zu entnehmen. Die Zellen wurden mit Hilfe des Haemocytometers gezählt und mit dem Konzentrationsfaktor verrechnet. Die entsprechende Zellmenge wurde mit 100  $\mu\text{L}$  Medium und 0,5 mg/ml (0,5  $\mu\text{L}$ ) IL6-neutralisierendem Antikörper oder 0,5  $\mu\text{L}$  PBS als Kontrolle auf die Wells gegeben. Zwölf Stunden vor dem MTT-Assay wurden die Zellen nüchtern gelassen. Das Medium wurde abgesaugt, mit PBS gespült und mit neuem Medium mit nur 0,1% FBS und jeweils PBS oder dem IL6-neutralisierendem Antikörper wieder in den Inkubator gestellt.

Nach 12h wurde 10  $\mu\text{L}$  MTT-Reagent nach Protokoll zugegeben und die Platte wieder in die Inkubatoren gestellt. Nach 2 Stunden wurde eine violette Färbung festgestellt und 100  $\mu\text{L}$  des MTT-Detergent hinzugegeben. Arbeiten mit dem MTT-Reagent und Detergent fanden bei Dunkelheit statt. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur in einem dunklen Raum wurde die Absorption bei 570 nm im NanoQuant infinite M200 Pro von Tecan mit dem Programm Tecan i-control gemessen.

### 3.7.2 Caspase-Assay

Das Caspase-Glo 3/7-Assay sollte für den Vergleich das Apoptoseverhalten zeigen.

Es wurden die gleichen Untersuchungsbedingungen wie bei dem MTT-Assay durchgeführt. Die Zellen wurden allerdings dauerhaft im Standard-Medium mit 10% FBS inkubiert.

Das Caspase-Glo-Reagenz wurde durch das Auflösen des Caspase-Glo-Substrates im Caspase-Glo-Puffer hergestellt. Im Dunkeln wurden zu den Wells 40  $\mu\text{L}$  der Caspase-Glo-Reagenz gegeben und die Platten 1 min bei 460 rpm unter Lichtschutz auf einen Schüttler gestellt. Nach einer Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur in einem dunklen Raum wurde die Luminescence im Glomax Multi Detection System gemessen.

### 3.7.3 Neurite Outgrowth-Assay

Mit Hilfe des Neurite Outgrowth-Assays sollte festgestellt werden, welches Wachstum und Differenzierung die Neuronen in den verschiedenen Gruppen haben und welche Unterschiede ersichtlich sind.

Das Assay ist eine Färbung der Zellen. Daher wurde das gleiche Protokoll der Vorbereitung der Färbung, wie für die Immunofluoreszenz, vorgenommen.

Im Anschluss an die Fixierung der Zellen wurden sie ebenfalls 15 min bei Raumtemperatur gelagert und mit PBS gespült. 5  $\mu\text{L}$  Cell Viability Indicator und 5  $\mu\text{L}$  Cell membrane Stain wurden in 5 mL PBS gelöst und 400  $\mu\text{L}$  pro Well auf die Deckgläser gegeben. Nach 15min Inkubationszeit wurde einmal mit PBS gespült und die Background Suppression (5  $\mu\text{L}$  in 5mL PBS) auf die Deckgläser gegeben. Anschließend wurden die Deckgläser wie in 3.7. beschrieben eingebettet.

Bei der Analyse des Assays wurde die gleiche Belichtungszeit wie bei Synapsin verwendet.

Es wurden 10 Gesichtsfelder mit einem 40er Objektiv aufgenommen und für die statistische Auswertung ausgemessen. Die Ausmessung des Dendrits wurde vom Soma bis Ende des Dendrits vorgenommen und die Gruppen wurden verglichen.

## 4 Ergebnisse

Ziel und Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Hyperoxie auf den Hippocampus der 28 Tage alten Maus und von HT22-Neuronen mit und ohne IL6-Suppression.

Hierfür wurden mehrere Aspekte molekularbiologischen-, proteinbiologischen Methoden, Färbungen und Assays untersucht.

Bei dem Tierversuch bestanden die Gruppe Normoxie Kontrolle aus 13 Tieren, die Gruppe Normoxie IL6-Knockout aus 20 Tieren, die Gruppe Hyperoxie Kontrolle aus 10 Tieren und die Gruppe Hyperoxie IL6-Knockout aus 15 Tieren.

Bei der Auswertung wurden die Ergebnisse mit einem Housekeeping-Genen genormt. GAPDH stellte sich durch eine konstante Expression bei allen Proben als Housekeeping-Gen für die qPCRs (sowohl TaqMan als auch SYBR-Green) und WesternBlots heraus.

Die Auswertung fand mittels der Software Graph-Pad 6 statt. Es wurde mittels des Grubbs-Test nach signifikanten Ausreißern gesucht und pro Analyse der Signifikanteste von der Analyse ausgeschlossen.

Die Signifikanzkontrolle wurde mit Hilfe des One-way-anova-Tests durchgeführt. Für parametrische Ergebnisse wurde der Test Bonferonie, für nicht-parametrische Ergebnisse der Test Dums durchgeführt. Ob Ergebnisse parametrisch oder nicht-parametrisch waren, wurde mit dem D'Agostino-Test ermittelt.

In den Abbildungen wurde die Gruppe Normoxie Kontrolle als Vergleich auf den Wert 1 normiert. Die Werte wurden als SEM (Standard Error of Means) dargestellt. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden ab einem P-Wert von  $\leq 0,05$  als signifikant dargestellt.

## 4.1 Inflammation/ IL6-Zytokinwirkung/ Gliose

Die Analyse der Inflammation, der IL6-Zytokinwirkung und der Gliose wurde mittels qPCRs der Gene IL6, IL6 neu IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , MCP1, TGF $\beta$  und CTGF und WesternBlots der Proteine SOCS3, pStat3/Stat3, GFAP und Iba1 untersucht. Die qPCRs und WesternBlots wurden an den Hippocampi der P28-Mäuse durchgeführt.

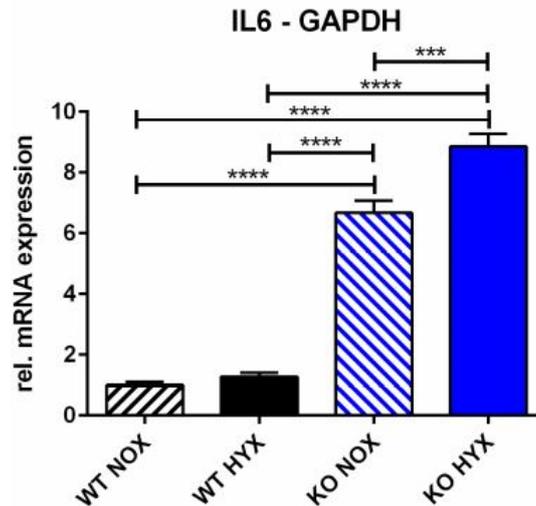


Abbildung 13: Relative mRNA-Expression von Gen IL6 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Die relative mRNA-Expression von IL6 (Abbildung 13) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

In den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt stärker aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Tiere ist signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

Die Ergebnisse der qPCR wurden mit einem anderen Primer, speziell für IL6-Knockout-Mäuse, überprüft.

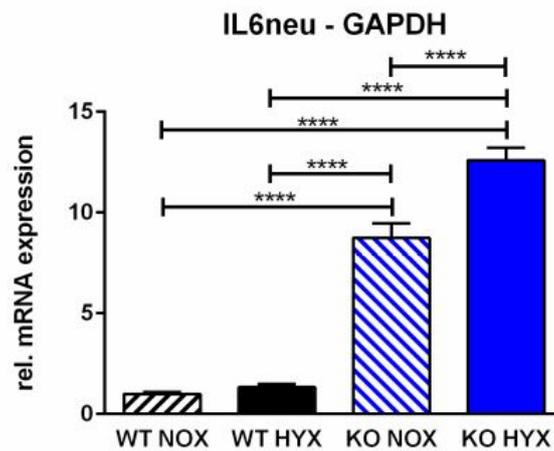


Abbildung 14: Relative mRNA-Expression von Gen IL6 (neuer Primer) im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.  
 \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Die relative mRNA-Expression von IL6 mit neuem Primer (Abbildung 14) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

In den IL6-Knockout-Mäusen zeigt sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt stärker aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Tiere ist signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

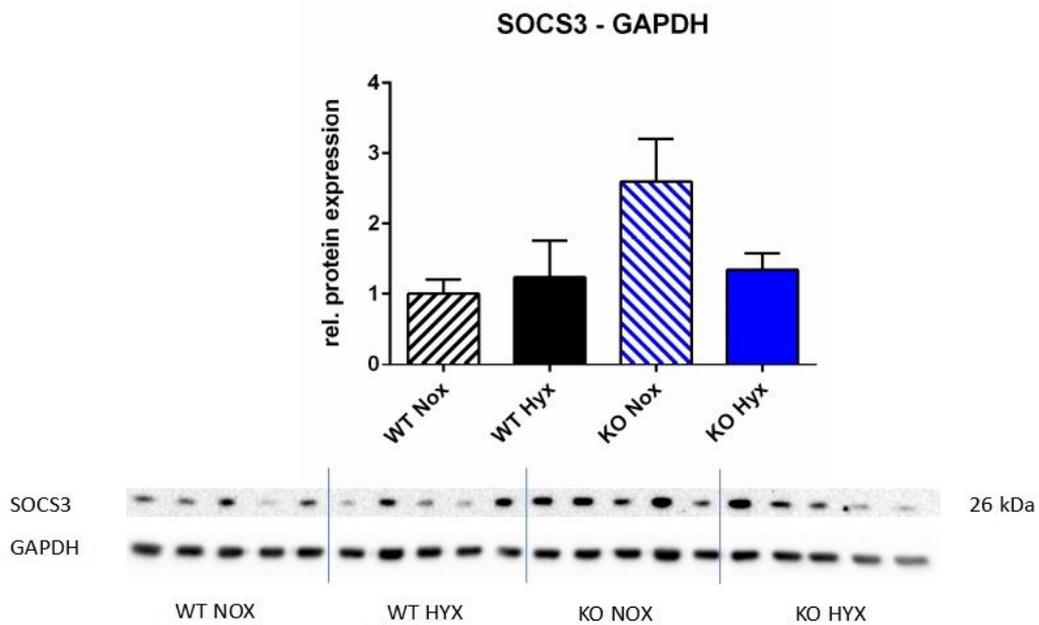


Abbildung 15: Relative Protein-Expression von Protein SOCS3 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

Die relative Protein-Expression von SOCS3 (Abbildung 15) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied, im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

In den IL6-Knockout-Mäusen zeigt sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt leicht stärker aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die Protein-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

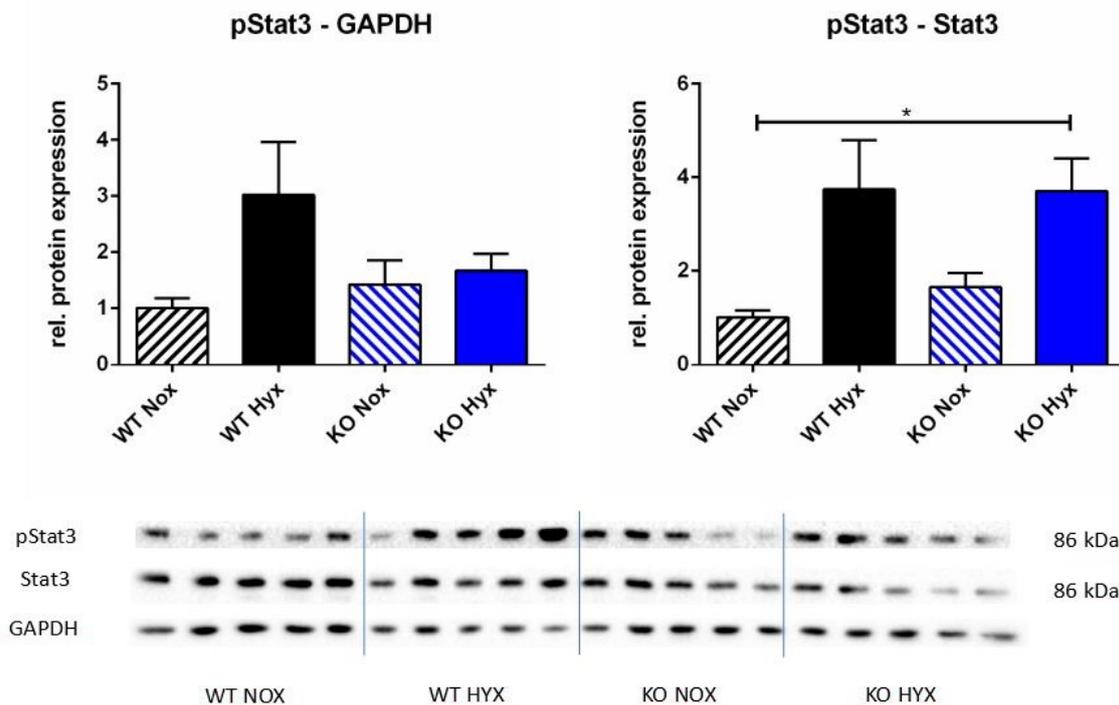


Abbildung 16: Relative Protein-Expression von Protein pSTAT3/STAT3 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.  
\*  $p \leq 0,05$

Die relative Protein-Expression von pStat3 (Abbildung 16) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6-Knockout-Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt leicht geringer aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die Protein-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

Der Anteil des phosphorylierten Stat3 im Vergleich zu Stat3 zeigt einen teils signifikanten Anstieg der relativen Protein-Expression in beiden Hyperoxie-Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Normoxie-Gruppen.

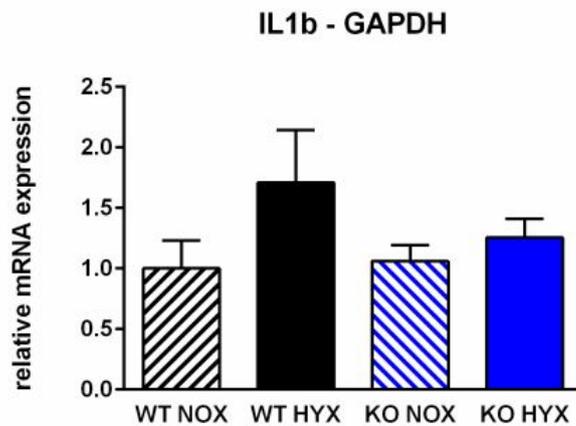


Abbildung 17: Relative mRNA-Expression von Gen IL1 beta im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

Die relative mRNA-Expression von IL1 beta (Abbildung 17) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

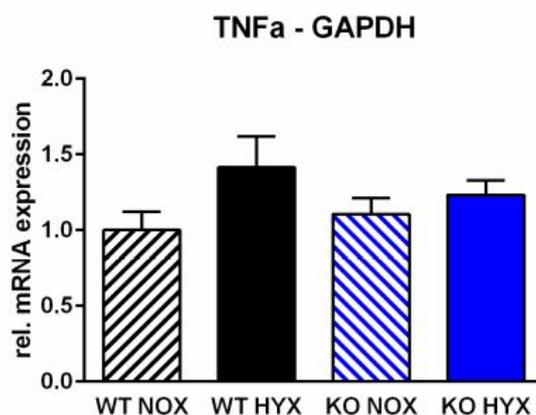


Abbildung 18: Relative mRNA-Expression von Gen TNF alpha im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

Die relative mRNA-Expression von TNF alpha (Abbildung 18) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.  
 Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

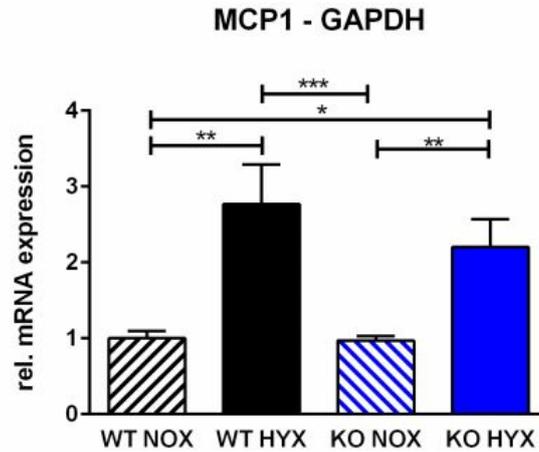


Abbildung 19: Relative mRNA-Expression von Gen MCP1 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

Die relative mRNA-Expression von MCP1 (Abbildung 19) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

Auch in den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt leicht geringer aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

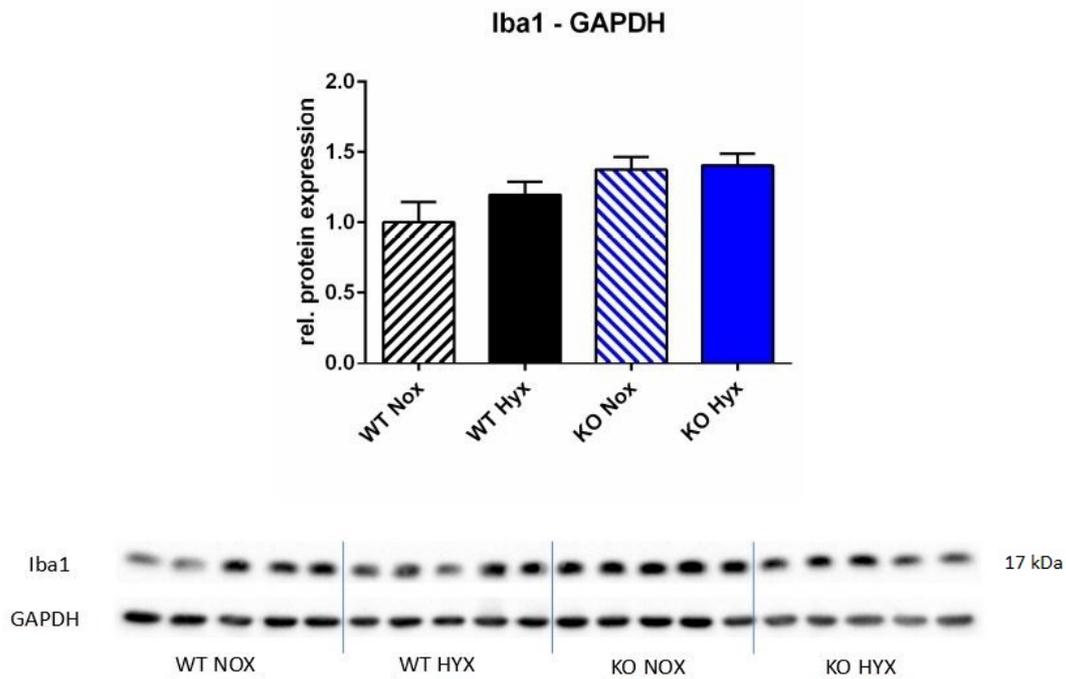


Abbildung 20: Relative Protein-Expression von Protein Iba1 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28

Die relative Protein-Expression von Iba1 (Abbildung 20) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

In den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.

Die Protein-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

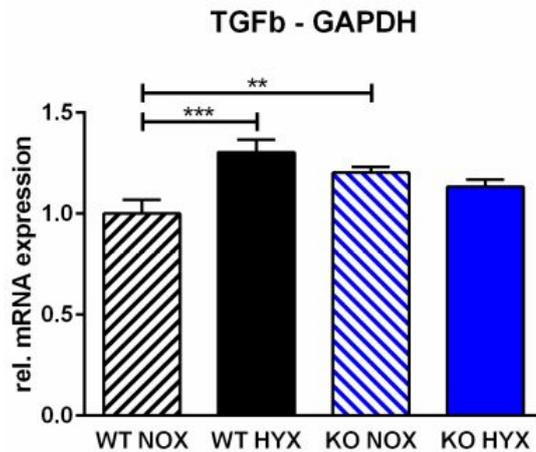


Abbildung 21: Relative mRNA-Expression von Gen TGF beta im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

Die relative mRNA-Expression von TGF beta (Abbildung 21) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

In den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt geringer aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

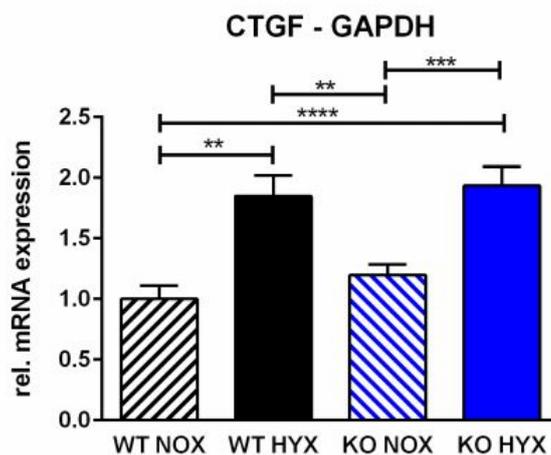


Abbildung 22: Relative mRNA-Expression von Gen CTGF im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Die relative mRNA-Expression von CTGF (Abbildung 22) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

Auch in den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in der Hyperoxie-

Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

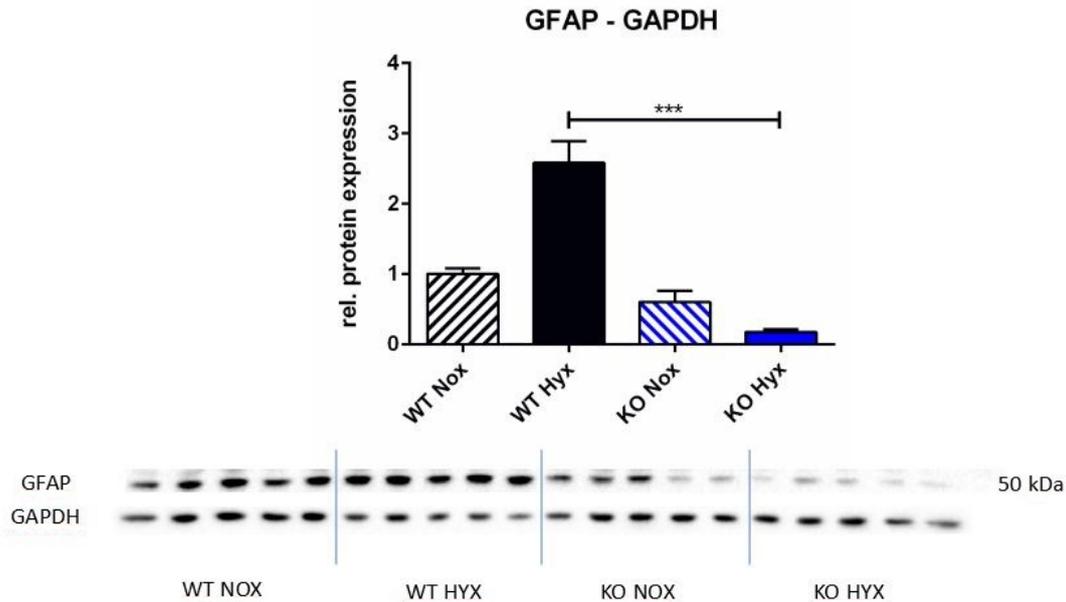


Abbildung 23: Relative Protein-Expression von Protein GFAP im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*\*\*  $p \leq 0,001$

Die relative Protein-Expression von GFAP (Abbildung 23) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6-Knockout-Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer leicht verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt geringer aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die Protein-Expression der IL6-Knockout-Tiere ist signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

## 4.2 Wachstum und Signalwege

Verschiedene mRNA (BDNF, GDNF, VEGF, PCNA und p21) und Proteine (Doublecortin, pErk/Erk, pAkt/Akt) wurden zur Beobachtung des Wachstumsverhaltens und der Ausbildung von Signalwegen mittels qPCR und Westernblot analysiert. Diese Ergebnisse beziehen sich auf die Hippocampi der 28 Tage alten Maus.

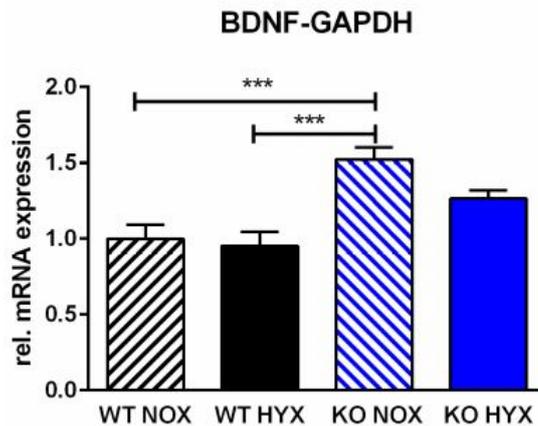


Abbildung 24: Relative mRNA-Expression von Gen BDNF im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*\*\*  $p \leq 0,001$

Die relative mRNA-Expression von BDNF (Abbildung 24) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

In den IL6-Knockout-Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt stärker aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt leicht stärker aus, als in den Wildtyp-Tieren.

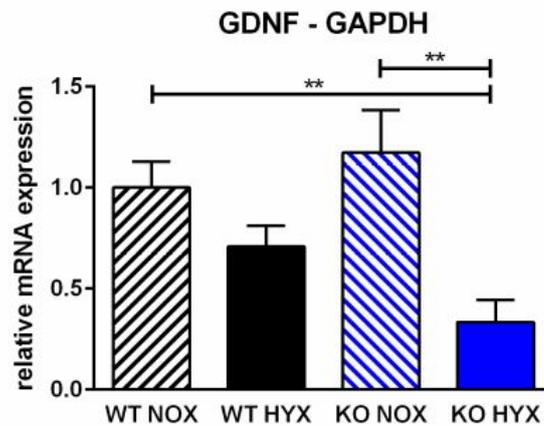


Abbildung 25: Relative mRNA-Expression von Gen GDNF im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.  
 \*\*  $p \leq 0,01$

Die relative mRNA-Expression von GDNF (Abbildung 25) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt. In den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression in der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt leicht stärker aus, als in den Wildtyp-Tieren. Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Hyperoxie-Tiere ist signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Wildtyp-Normoxie-Tieren.

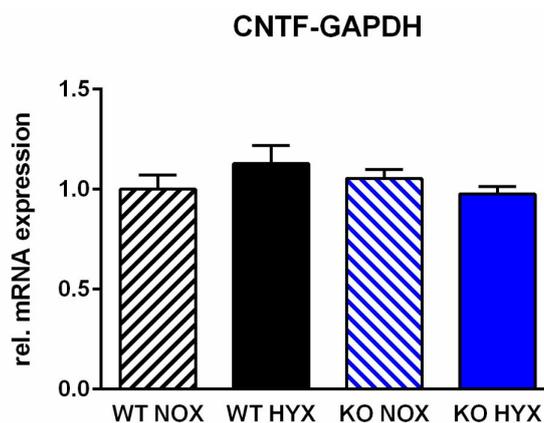


Abbildung 26: Relative mRNA-Expression von Gen CNTF im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28

Die relative mRNA-Expression von CNTF (Abbildung 26) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe. Auch in den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyper-

oxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

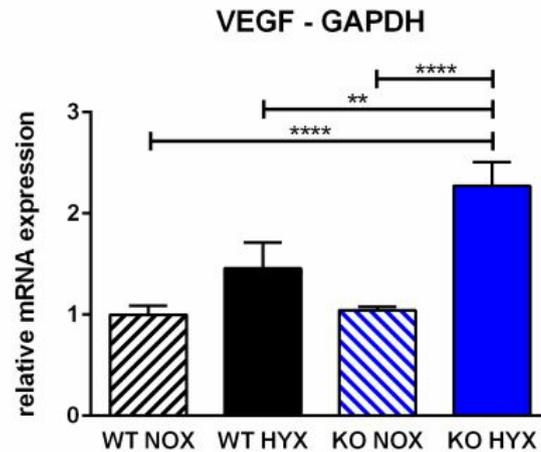


Abbildung 27: Relative mRNA-Expression von Gen VEGF im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Die relative mRNA-Expression von VEGF (Abbildung 27) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt leicht stärker aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Hyperoxie-Tiere ist signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

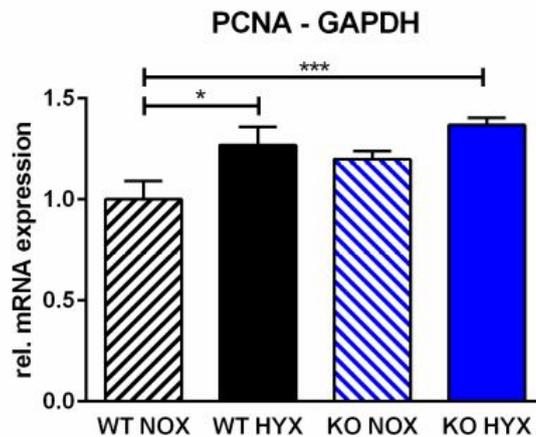


Abbildung 28: Relative mRNA-Expression von Gen PCNA im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

Die relative mRNA-Expression von PCNA (Abbildung 28) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

In den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt leicht geringer aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Hyperoxie-Tiere ist signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Normoxie-Tieren.

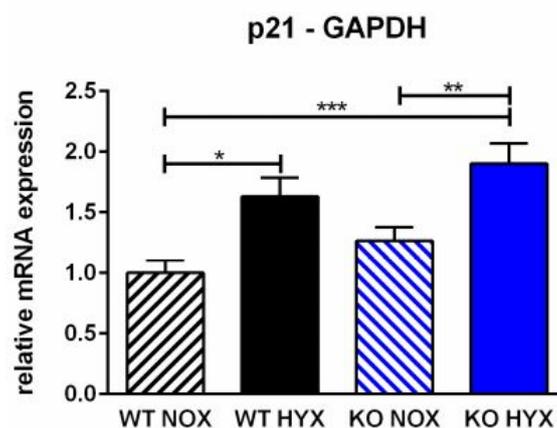


Abbildung 29: Relative mRNA-Expression von Gen p21 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

Die relative mRNA-Expression von p21 (Abbildung 29) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

Auch in den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Hyperoxie-Tiere ist signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Normoxie-Tieren.

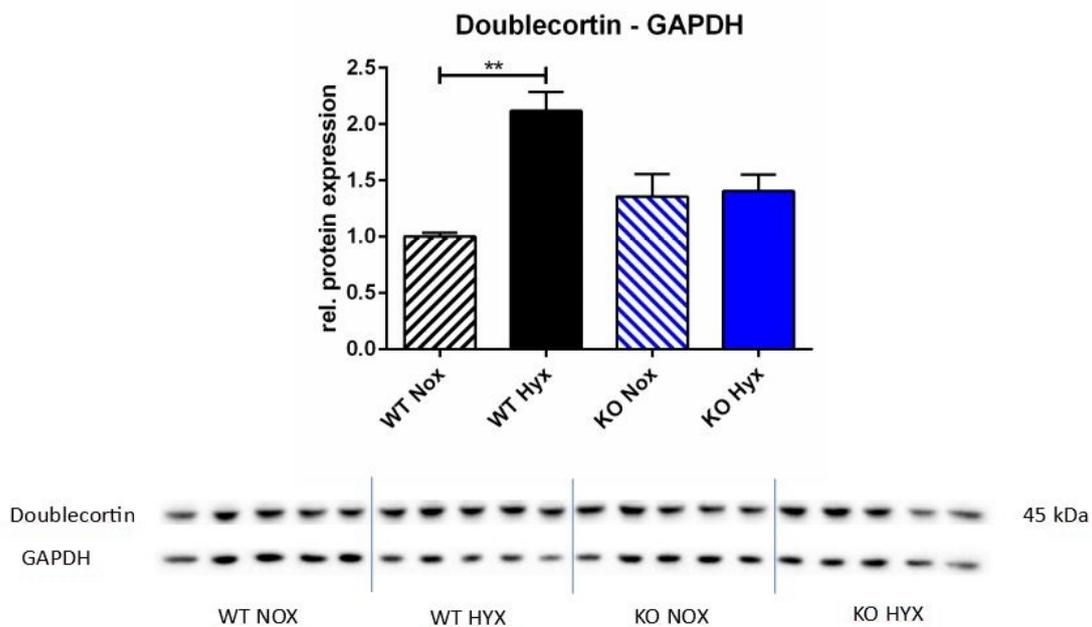


Abbildung 30: Relative Protein-Expression von Protein Doublecortin im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*\*  $p \leq 0,01$

Die relative Protein-Expression von Doublecortin (Abbildung 30) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

In den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.

Die Protein-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

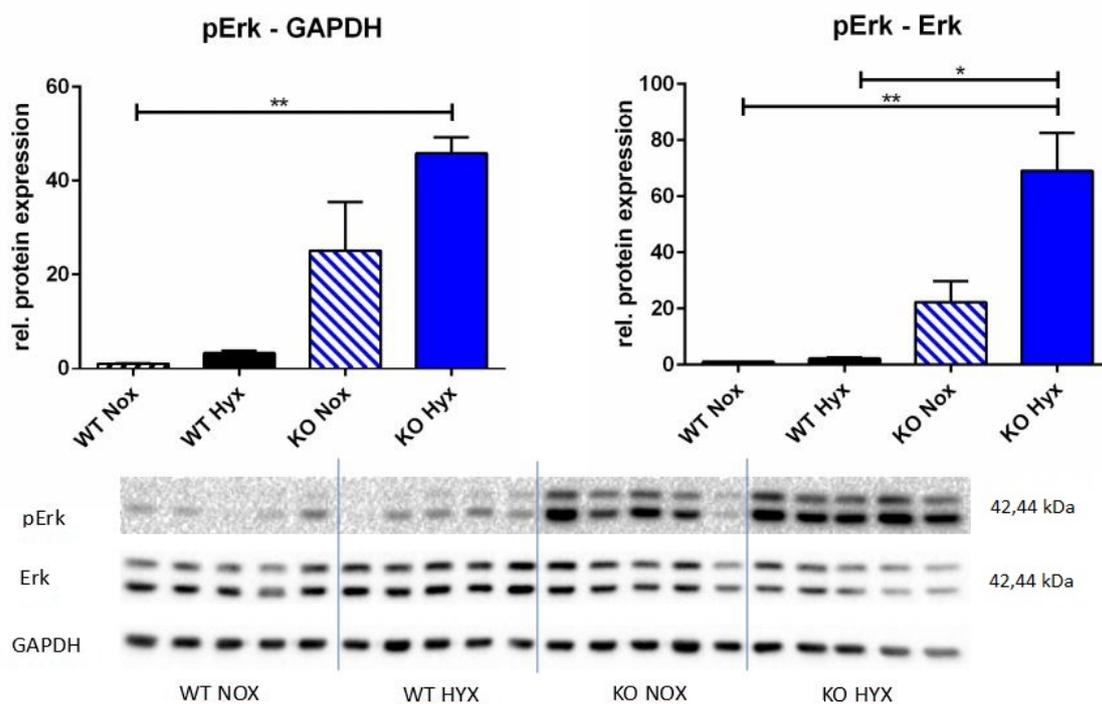


Abbildung 31: Relative Protein-Expression von Protein pErk/Erk im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

Die relative Protein-Expression von pErk (Abbildung 31) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

In den IL6-Knockout-Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt stärker aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die Protein-Expression der IL6-Knockout-Hyperoxie-Tiere ist signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Normoxie-Tieren.

Der Anteil des phosphorylierten Erk im Vergleich zu Erk zeigt einen Anstieg der relativen Protein-Expression in beiden IL6-Knockout-Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Gruppen, teils signifikant.

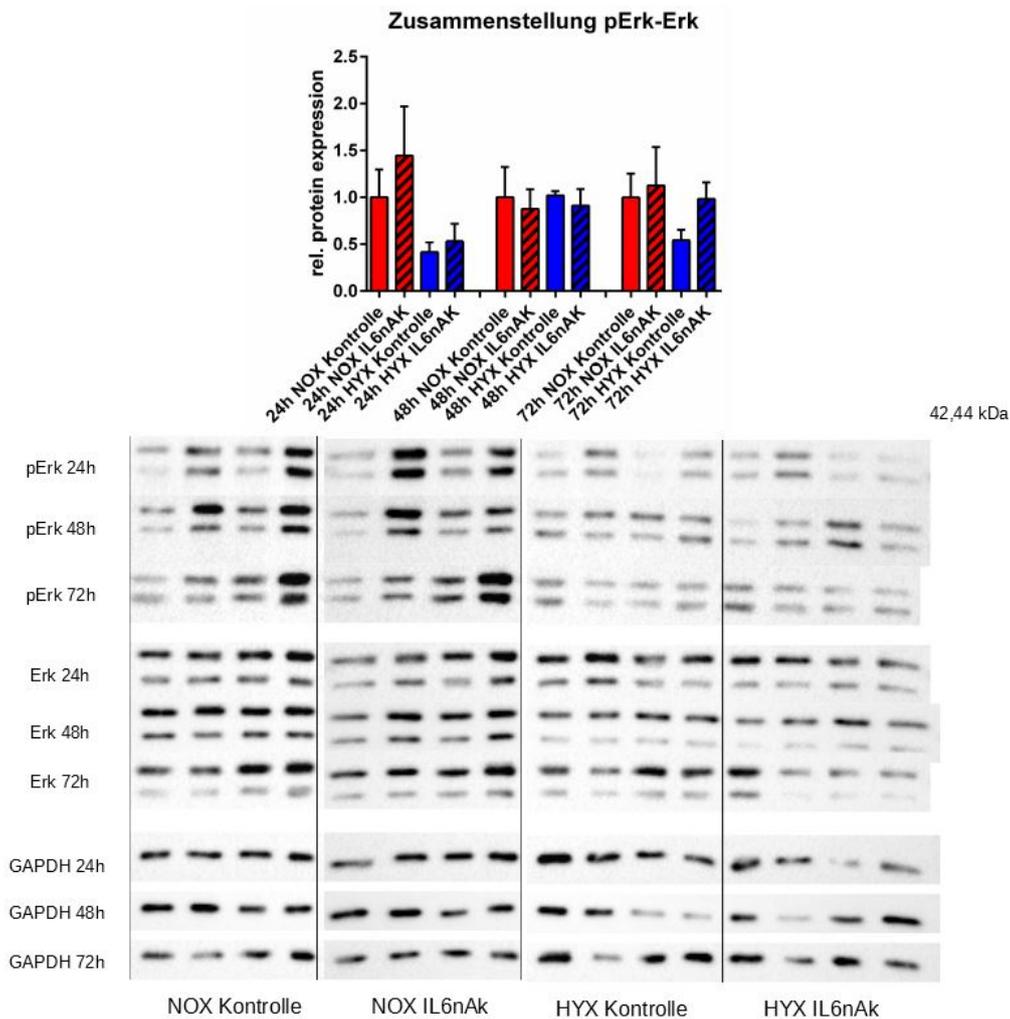


Abbildung 32: Relative Protein-Expression von Protein pErk/Erk in HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rot mit schwarzen Schraffierungen) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (blau mit schwarzen Schraffierungen) 24h, 48h und 72h.

Nach 24 Stunden zeigt die relative Protein-Expression von pErk zu Erk (Abbildung 32) in der Kontroll-Hyperoxie-Gruppe keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontroll-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6nAk-Gruppen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expressionen der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich ebenfalls eine Tendenz an, dass es zu einer gering verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Die Protein-Expression der IL6nAk-Gruppen ist tendenziell erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen.

Nach 48 Stunden zeigt die relative Protein-Expression von pErk zu Erk in der Kontroll-Hyperoxie-Gruppe keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontroll-Normoxie-Gruppe.

In den IL6nAk-Gruppen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expressionen der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Nach 72 Stunden zeigt die relative Protein-Expression von pErk zu Erk in der Kontroll-Hyperoxie-Gruppe weiterhin keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontroll-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6nAk-Gruppen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expressionen der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Die Protein-Expression der IL6nAk-Hyperoxie-Gruppe ist tendenziell erhöht im Vergleich zu der Kontroll-Hyperoxie-Gruppe.

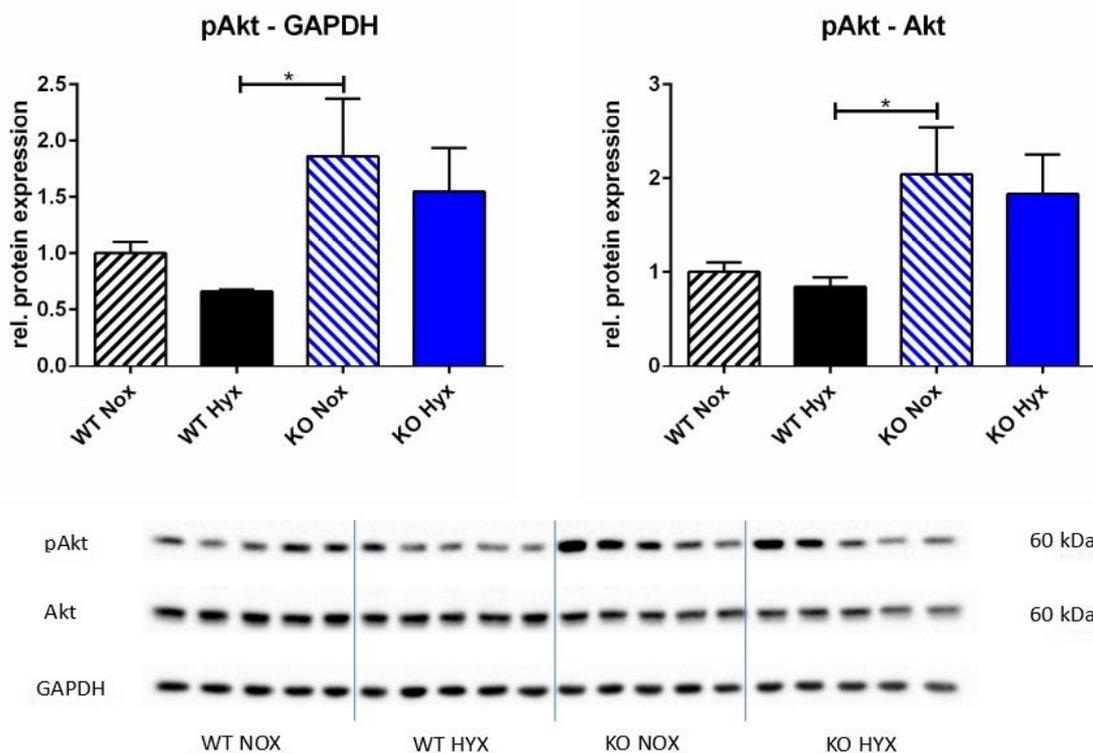


Abbildung 33: Relative Protein-Expression von Protein pAkt/Akt im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*  $p \leq 0,05$

Die relative Protein-Expression von pAkt (Abbildung 33) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Auch in den IL6-Knockout-Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich ebenfalls eine Tendenz an, dass es zu einer verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.

Die Protein-Expression der IL6-Knockout-Normoxie-Tiere ist signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Hyperoxie-Tieren.

Der Anteil des phosphorylierten Akt im Vergleich zu Akt zeigt einen Anstieg der relativen Protein-Expression in

beiden IL6-Knockout-Gruppen im Vergleich zu den Wildtyp-Gruppen, teils signifikant.

Bezüglich dieser Punkte können auch einige Versuche im Zellmodell analysiert werden. Es wurden Western-Blots von pErk/Erk und pAkt/Akt zu den drei verschiedenen Zeitpunkten 24h, 48h und 72h durchgeführt. Zudem wurde ein MTT-Assay ausgeführt.

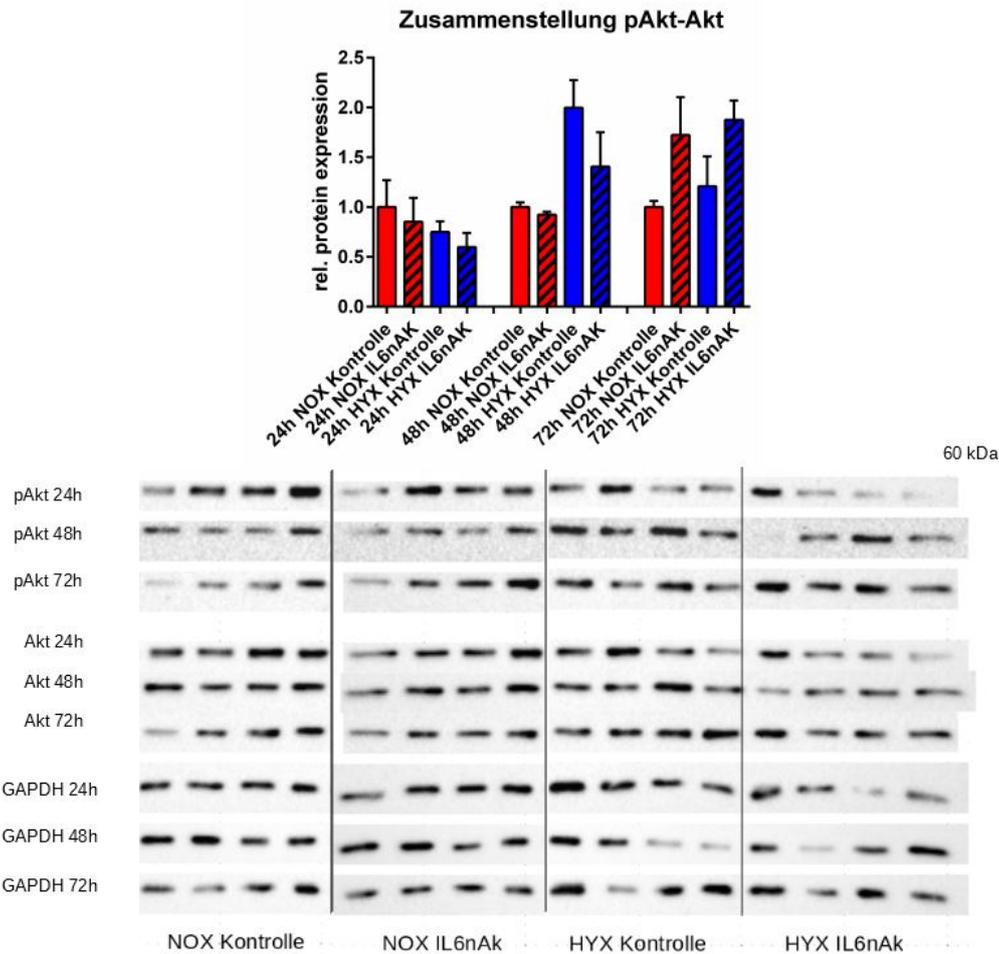


Abbildung 34: Relative Protein-Expression von Protein pErk/Erk in HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rot mit schwarzen Schraffierungen) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (blau mit schwarzen Schraffierungen) 24h, 48h und 72h.

Nach 24 Stunden zeigt die relative Protein-Expression von pAkt zu Akt (Abbildung 34) in der Kontroll-Hyperoxie-Gruppe keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontroll-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6nAk-Gruppen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expressionen der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich ebenfalls eine Tendenz an, dass es zu einer verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Nach 48 Stunden zeigt die relative Protein-Expression von pAkt zu Akt in der Kontroll-Hyperoxie-Gruppe weiterhin keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontroll-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6nAk-Gruppen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expressionen der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich ebenfalls eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Die Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppen ist tendenziell erhöht im Vergleich zu den Normoxie-Gruppen.

Nach 72 Stunden zeigt die relative Protein-Expression von pAkt zu Akt in der Kontroll-Hyperoxie-Gruppe weiterhin keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontroll-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer leicht vermehrten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6nAk-Gruppen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expressionen der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich ebenfalls eine Tendenz an, dass es zu einer leicht vermehrten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Die Protein-Expression der IL6nAk-Gruppen ist tendenziell erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen.

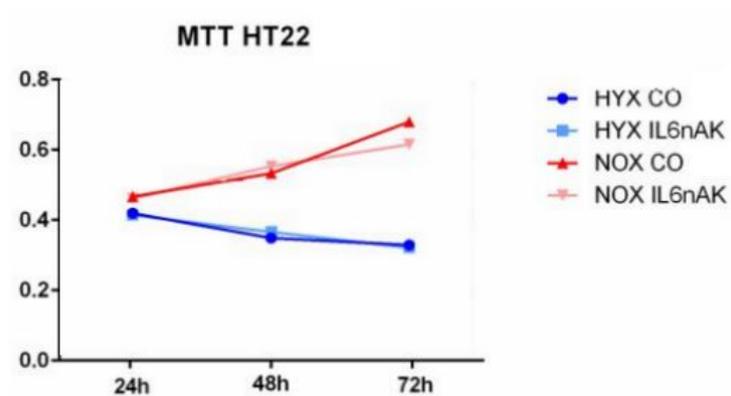


Abbildung 35: MTT-Assay von HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rosa) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (hellblau) 24h, 48h und 72h.

Das MTT-Assay (Abbildung 35) zeigt eine Zunahme der Proliferation in beiden Normoxie-Gruppen und im Vergleich dazu eine Abnahme der Proliferation in den Hyperoxie-Gruppen.

### 4.3 Apoptose

Im vorherigen Abschnitt 4.2 wurde das Wachstum und die Ausbildung der Signalwege analysiert. Als Gegenspieler ist nun der Faktor der Apoptose zu betrachten. Hier wurden zuerst wieder die Hippocampi der P28-Mäuse analysiert.

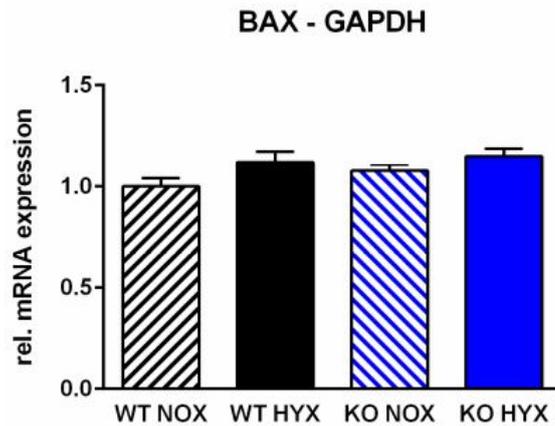


Abbildung 36: Relative mRNA-Expression von Gen BAX im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

Die relative mRNA-Expression von BAX (Abbildung 36) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

Auch in den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

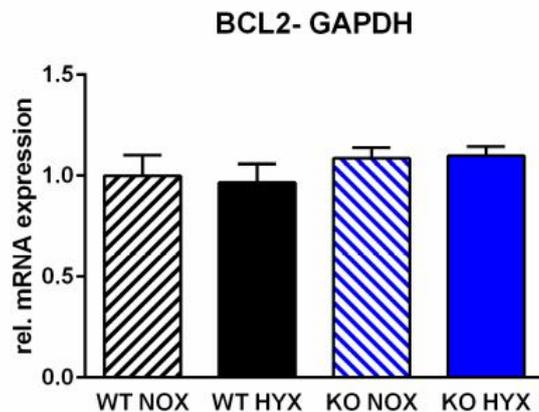


Abbildung 37: Relative mRNA-Expression von Gen BCL2 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

Die relative mRNA-Expression von BCL2 (Abbildung 37) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten

Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

Auch in den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

In der Zellkultur wurde ebenfalls die Auswirkung von Hyperoxie und IL6 auf die HT22-Zellen mit Hilfe des Caspase-Assays untersucht.

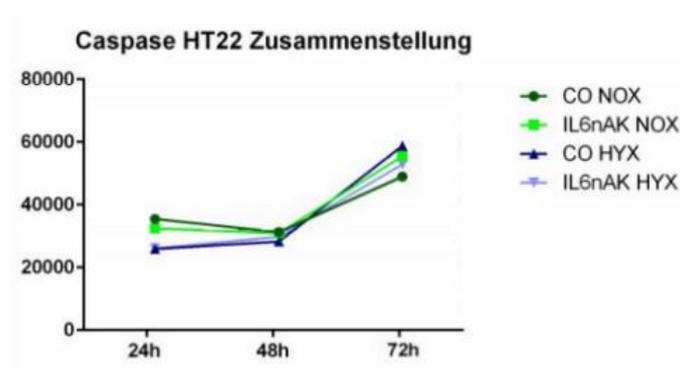


Abbildung 38: Caspase-Assay von HT22-Zellen unter Normoxie (grüner Kreis), HT22-Zellen unter Hyperoxie (dunkelblaues Dreieck), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (grünes Quadrat) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (hellblaues Dreieck) 24h, 48h und 72h.

Das Caspase-Assay zeigt eine gleichmäßige Apoptose aller Gruppen an, welche ab 48h zunimmt.

## 4.4 Plastizität

Zur Analyse der möglichen Veränderungen der Plastizität wurde die mRNA von *cfos* per qPCR und die Proteine pCAMKII/CAMKII, pSynapsin/Synapsin und GAP43 analysiert. Diese Analysen beziehen sich auf die Hippocampi der P28-Mäuse.

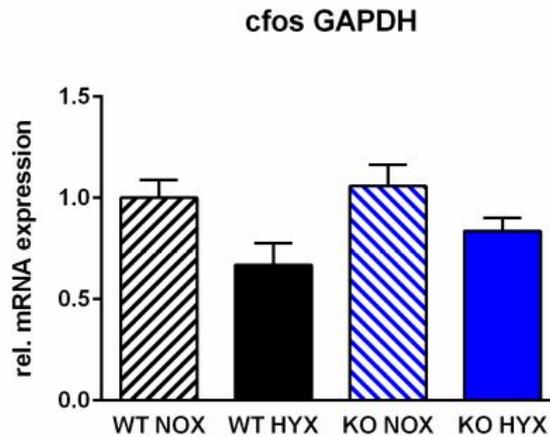


Abbildung 39: Relative mRNA-Expression von Gen *cfos* im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

Die relative mRNA-Expression von *cfos* (Abbildung 39) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Auch in den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich ebenfalls eine Tendenz an, dass es zu einer verminderten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.

Die mRNA-Expression der IL6-Knockout-Tiere zeigt keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren.

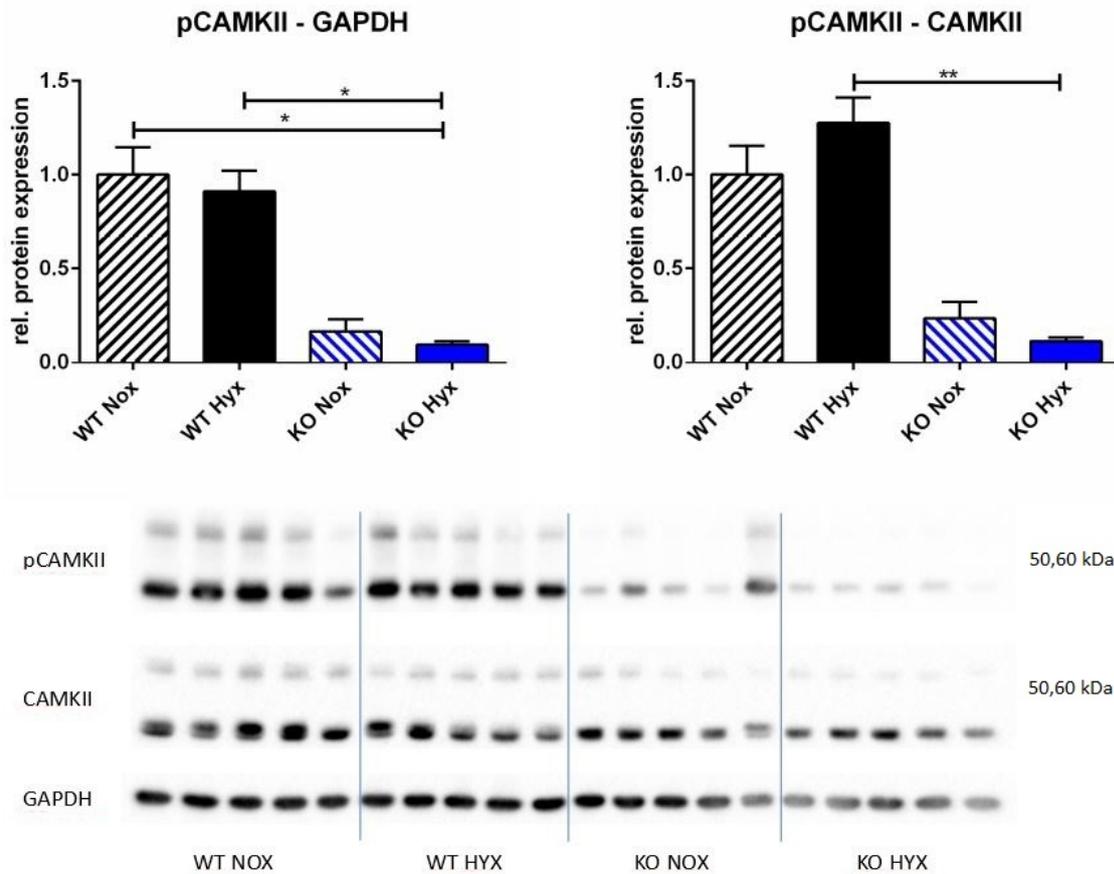


Abbildung 40: Relative Protein-Expression von Protein pCAMKII/CAMKII im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

Die relative Protein-Expression von pCAMKII (Abbildung 40) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

Auch in den IL6-Knockout- Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren ist unverändert zu dem in den Wildtyp-Tieren.

Die Protein-Expression der IL6-Knockout-Tiere ist signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

Der Anteil des phosphorylierten CAMKII im Vergleich zu CAMKII zeigt einen Abfall der relativen Protein-Expression in beiden IL6-Knockout-Gruppen im Vergleich zu den Wildtyp-Gruppen, teils signifikant.

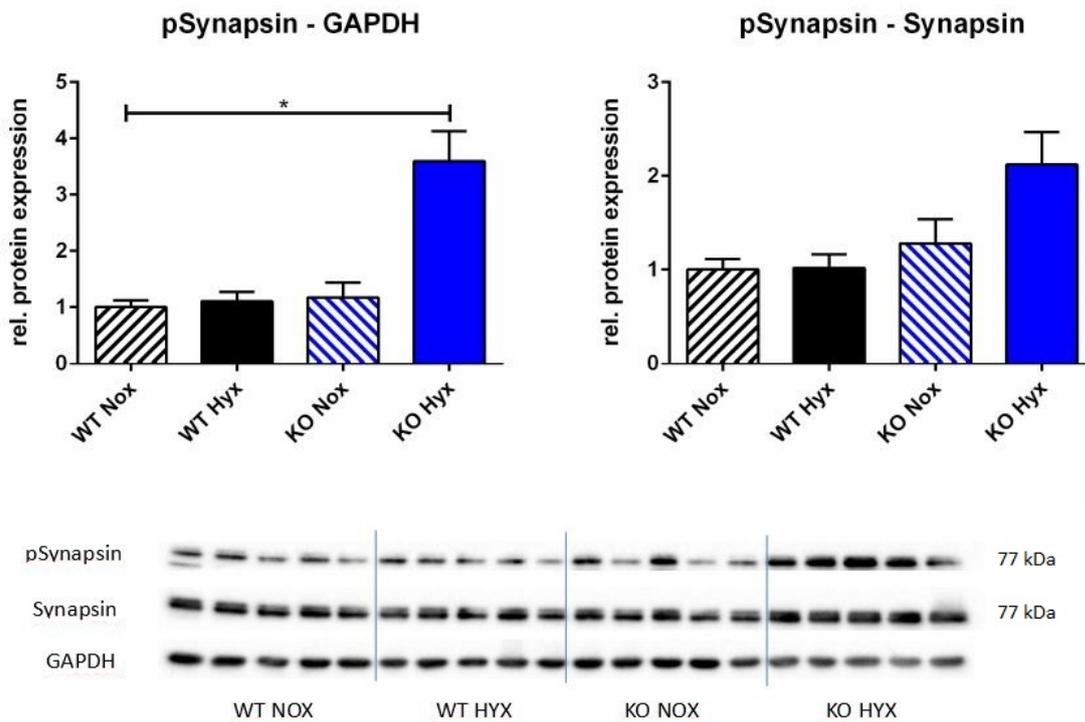


Abbildung 41: Relative Protein-Expression von Protein pSynapsin/Synapsin im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.  
\*  $p \leq 0,05$

Die relative Protein-Expression von pSynapsin (Abbildung 41) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

In den IL6-Knockout-Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt stärker aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die Protein-Expression der IL6-Knockout-Hyperoxie-Tiere ist signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Normoxie-Tieren.

Der Anteil des phosphorylierten Synapsin im Vergleich zu Synapsin zeigt einen leichten, tendenziellen Anstieg der relativen Protein-Expression in der IL6-Knockout-Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen.

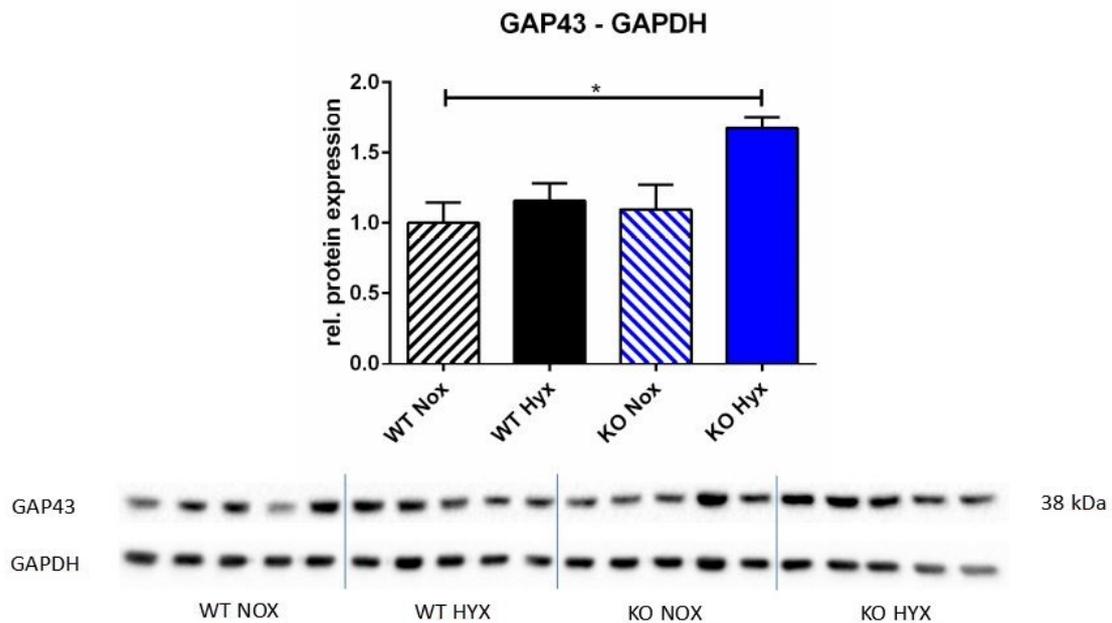


Abbildung 42: Relative Protein-Expression von Protein GAP43 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28.

\*  $p \leq 0,05$

Die relative Protein-Expression von GAP43 (Abbildung 42) ist in der Wildtyp-Hyperoxie-Gruppe ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Wildtyp-Normoxie-Gruppe.

In den IL6-Knockout-Mäusen zeigt sich keine signifikanten Unterschiede der Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten Protein-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Der Unterschied in den IL6-Knockout-Tieren fällt leicht stärker aus, als in den Wildtyp-Tieren.

Die Protein-Expression der IL6-Knockout-Hyperoxie-Tiere ist signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Normoxie-Tieren.

Ergänzend zu den Analysen der P28-Hippocampi kann man noch die durchgeführte qPCR von *cfos* der HT22-Zellen und die Immunofluoreszenzfärbung von Synapsin mit in die Analyse einbeziehen.

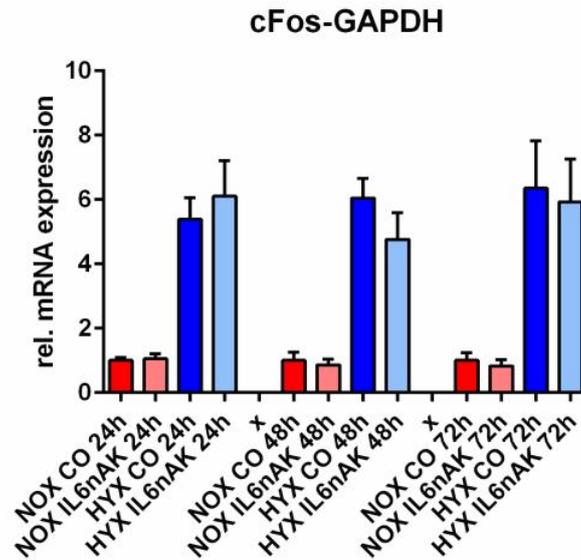


Abbildung 43: Relative mRNA-Expression von Gen cFos in HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rosa) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (hellblau) 24h, 48h und 72h.

Nach 24 Stunden zeigt die relative mRNA-Expression von cfos (Abbildung 43) in der Kontroll-Hyperoxie-Gruppe keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontroll-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6nAk-Gruppen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich ebenfalls eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Nach 48 Stunden zeigt die relative mRNA-Expression von cfos in der Kontroll-Hyperoxie-Gruppe weiterhin keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontroll-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6nAk-Gruppen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich ebenfalls eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

Nach 72 Stunden zeigt die relative mRNA-Expression von cfos in der Kontroll-Hyperoxie-Gruppe weiterhin keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontroll-Normoxie-Gruppe. Es deutet sich eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

In den IL6nAk-Gruppen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zu der Normoxie-Gruppe. Es deutet sich ebenfalls eine Tendenz an, dass es zu einer vermehrten mRNA-Expression der Hyperoxie-Gruppe kommt.

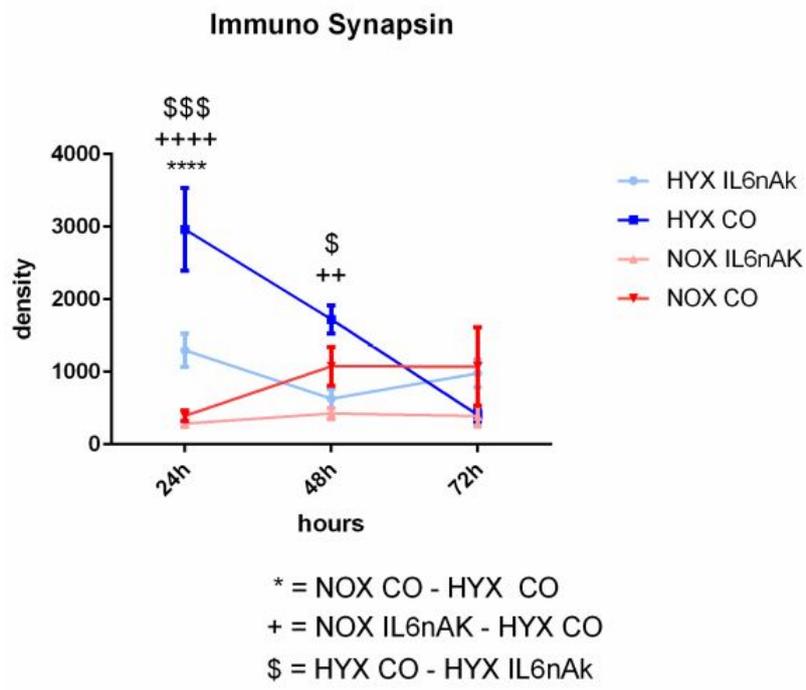


Abbildung 44: Synapsin Immunofluoreszenz von HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rosa) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (hellblau) 24h, 48h und 72h.  
 \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

In der Immunofluoreszenz von Synapsin zeigt sich eine signifikant vermehrte Expression von Synapsin in beiden Hyperoxie-Gruppen. Die Kontrollgruppe hat allerdings noch eine höhere Expression als die IL6nAk-Gruppe. Nach 48h sinkt die Expression von Synapsin in den Hyperoxie-Gruppen ab. Die Hyperoxie-Kontroll-Gruppe ist allerdings immer noch signifikant gegenüber beider IL6nAk-Gruppen erhöht. Nach 72h sinkt die Expression von Synapsin in der Hyperoxie-Kontroll-Gruppe weiter ab, sodass kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Gruppen besteht.

neurite outgrowth Ausläufer Summe/Anzahl der Zellen

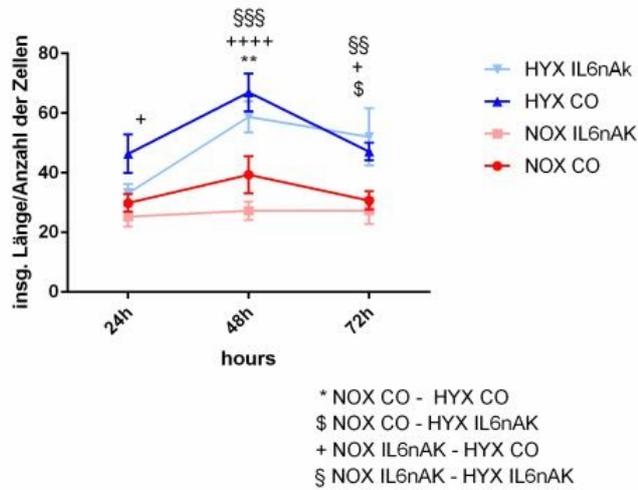


Abbildung 45: Neurite outgrowth von HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rosa) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (hellblau) 24h, 48h und 72h.

\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Im neurite outgrowth Assay erkennt man, dass die Ausläufer beider Hyperoxie-Gruppen signifikant länger als die der Normoxie-Gruppen sind. Beide IL6nAk-Gruppen haben wiederum signifikant kürzere Ausläufer als die Kontroll-Gruppen.

## 5 Diskussion

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist der Gebrauch von reinem Sauerstoff eine tägliche Routine in der Therapie von vielen Krankheiten im Krankenhaus geworden. Hierbei erstreckt sich die Altersspanne der Therapie von Früh- beziehungsweise Neugeborenen bis zur Geriatrie.

Doch insbesondere in der Neonatologie und in der Pädiatrie sind auch die Nebenwirkungen der Sauerstofftherapie zu berücksichtigen.

So kommt es nachgewiesenermaßen zu Netzhautschäden wie der Retinopathia praematurorum (Northway, Rosan & Porter 1967) und zu Lungenschäden wie der bronchopulmonalen Dysplasie (Stahl & Göpel 2015).

Verschiedene Publikationen deuten zudem darauf hin, dass es auch Schädigungen im Gehirn durch die Sauerstofftherapie gibt. Hier betreffen die Schädigungen wichtige Strukturen wie Neuronen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia (Reich et al. 2017). In weiteren Untersuchungen zeigten sich auch Hirnreifungsverzögerungen sowie Verhaltensauffälligkeiten, Defizite im räumlichen Denken und Gedächtnisstörungen (Felderhoff-Mueser, Bittigau et al. 2004, Felderhoff-Mueser, Marco Sifringer et al. 2005, Gerstner et al. 2006, Ramani et al. 2013). Auf molekularer Ebene zeigt sich im Gehirn eine Induktion von Inflammation und Apoptose (Dzietko, Boos et al. 2008, M. Sifringer, Brait et al. 2010, M. Sifringer, Bendix et al. 2012).

Es wäre demnach interessant zu erarbeiten, wie sich die Sauerstofftherapie auf spezifische Bereiche des Gehirns auswirkt. Der in dieser Arbeit untersuchte Bereich ist der Hippocampus.

Der Hippocampus formt das räumliche und zeitliche Gedächtnis (Dekeyser et al. 2016) und ist ein wichtiger Bestandteil bei Lernprozessen und Gedächtnisanpassung (Treves & Rolls 1994).

Zudem werden in dieser Arbeit immortalisierte Neuronen des Hippocampus untersucht, um die spezifischen Auswirkungen auf diese Struktur des Hippocampus herauszuarbeiten.

Um die Auswirkungen von Hyperoxie auf den Hippocampus zu untersuchen, wurden Auswirkungen der Hyperoxie auf Inflammation, Wachstumssignalwege, Apoptose und Plastizität untersucht.

In der Lunge konnte bereits ein direkter Zusammenhang von Interleukin 6 zur sauerstoffinduzierten Inflammation gezeigt werden (Weichelt et al. 2013, Kim et al. 2010). Ein möglicher Therapieansatz wäre es demnach, Interleukin-6 zu blocken.

In dieser Arbeit wird ebenfalls die Auswirkung einer Interleukin 6-Blockade im Gehirn durch Knockout beim in vivo-Experiment und neutralisierendem Antikörper beim in vitro-Experiment untersucht. Sollten sich negative Auswirkungen von Hyperoxie durch eine Interleukin 6-Blockade minimieren lassen, würde sich hierdurch eine Therapieoption eröffnen.

### 5.1 Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Inflammation, IL-6-Zytokinwirkung und Gliose

In den durchgeführten Versuchen zeigen sich größtenteils die zu erwartenden Veränderungen durch Hyperoxie auf Inflammation, IL-6-Zytokinwirkung und Gliose. Besonders hervorzuheben sind die signifikanten Ergebnisse der erhöhten Expression von MCP1, TFG beta und CTGF, welches eine Induktion der Makrophageninfiltration

(Deshmane et al. 2009), sowie Überleben, Differenzierung und Aktivierung der Astrozyten (Diniz et al. 2019, Abreu et al. 2002) bedeutet. Durch die Interleukin-6-Blockade zeigen sich keine signifikanten Veränderungen.

Tabelle 11: Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Inflammation, IL-6-Zytokinwirkung und Gliose

	Literatur HYX	Versuche HYX	Versuche IL6-/-
IL 1 beta	erhöht	(erhöht)	(kein Unterschied zum WT)
TNF alpha	erhöht (Lunge)	(erhöht)	(kein Unterschied zum WT)
MCP 1	erhöht (Lunge)	erhöht	geringerer Unterschied als im WT
TGF beta	erhöht	erhöht	(keine erhöhte Expression bei HYX)
SOCS 3	(zu erwarten: erhöht)	kein Unterschied	(vermehrte Expression bei NOX) (geringere Expression bei HYX)
STAT 3	(zu erwarten: erhöht)	(erhöht)	(kein erhöhte Expression bei HYX)
GFAP	kein Unterschied (Retina)	(erhöht)	(geringere Expression bei HYX)
CTGF	erhöht (Lunge)	erhöht	(kein Unterschied zum WT)
Iba 1	(zu erwarten: erhöht)	(leicht erhöht)	(kein Unterschied zum WT)

Tabelle 11 fasst die Ergebnisse aus der Literatur und den durchgeführten Versuchen zusammen und stellt die Ergebnisse gegenüber. Die eingeklammerten Veränderungen sind nicht signifikant.

Die drei signifikante Ergebnisse der erhöhten Expression von **MCP 1**, **TGF beta** und **CTGF** entsprechen den Ergebnissen der Literatur.

**MCP 1** zeigt eine vermehrte Expression durch Hyperoxie in vivo (P28), welche in der Literatur ebenfalls im Lungengewebe beschrieben wird (K. Zhang et al. 2018). Dies könnte die Annahme untermauern, dass ablaufenden inflammatorischen Prozesse und Makrophageninfiltration durch Hyperoxie stimuliert werden.

In der Literatur wird ein Anstieg der Expression von **TFG beta** durch Hyperoxie im Gehirn beschrieben (T. Zhang et al. 2019). Dies bestätigt sich in den hier durchgeführten Versuchen in vivo (P28). Durch den Interleukin-6-Knockout zeigt sich hingegen keine erhöhte Expression bei Hyperoxie mehr. Dies könnte darauf hindeuten, dass durch die Abwesenheit von Interleukin 6 die Signalkaskade zur vermehrten Ausschüttung von TGF beta bei Hyperoxie unterbrochen wird, sodass es zu einem geringeren Zellüberleben und zu einer geringeren Astrozytendifferenzierung durch TGF beta kommt (Diniz et al. 2019). Dies könnte durch eine verminderte Ausschüttung von gemeinsamen Signalfaktoren wie STAT3 und Smad3 zustande kommen. Versuche von Shochet et al. zeigen, dass durch eine medikamentöse Blockade von Interleukin 6 mit Tocilizumab eine vermehrte Ausschüttung von STAT3 und Smad3 gehemmt wird (Epstein Shochet et al. 2020).

Bei **CTGF** zeigt sich ebenfalls eine vermehrte Expression durch Hyperoxie in vivo (P28). Diese Ergebnisse spiegeln sich in der Literatur im Lungengewebe wieder (Xinbao Wang, Cui & S. Wu 2019). Dies könnte die Aktivierung von Angiogenese, Neovaskularisation und Wundheilung durch Astrozytenaktivierung bei Hyperoxie zeigen (Abreu et al. 2002).

Bei den folgenden Genen **Interleukin 1 beta** und **TNF alpha** zeigt sich ein nicht-signifikanter Anstieg der Ex-

pression bei Hyperoxie, wobei ein signifikanter Anstieg der Expression in der Literatur beschrieben wird.

**Interleukin 1 beta** zeigt eine erhöhte Expression bei Hyperoxie in der Literatur (Felderhoff-Mueser, O. I. Schmidt et al. 2005), welches für die Aktivierung von Inflammation und Reparaturmechanismen durch Hyperoxie sprechen könnte (Dinarello 1988). In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich, gemäß der Literatur, die Tendenz der erhöhten Expression in vivo (P28). Allerdings sind diese Veränderungen nicht signifikant. Dies könnte, unter anderem, durch eine zu geringe Versuchsanzahl bedingt sein. Die Versuche von Felderhoff-Mueser analysieren allerdings lediglich 5 Proben aus dem Thalamus, Gyrus cinguli und Striatum (Felderhoff-Mueser, O. I. Schmidt et al. 2005). Möglicherweise zeigt sich im Gewebe des Hippocampus eine geringere Interleukin 1 beta-Ausschüttung als in den anderen Arealen. Auch wird in der Publikation von Felderhoff-Mueser beschrieben, dass der Expressions-Peak von Interleukin 1 beta bei 6 Stunden liegt und im Anschluss zur Basalrate zurückkehrt (Felderhoff-Mueser, O. I. Schmidt et al. 2005). Dies könnte ebenfalls ein Grund dafür sein, dass die Expression bei Hyperoxie in vivo (P28), bei der die Expression erstmalig nach 28 Tagen gemessen wird, nicht signifikant erhöht ist.

Durch den Interleukin-6-Knockout in vivo (P28) zeigt sich kein signifikanter Unterschied durch Hyperoxie. Dies könnte auf einen Interleukin-6 unabhängigen Signalweg hindeuten.

In der Literatur wird eine vermehrte Expression von **TNF alpha** durch Hyperoxie in der Lunge beschrieben (You et al. 2019). In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich ebenso eine tendenziell vermehrte Expression in vivo (P28) bei Hyperoxie. Die Veränderungen sind ebenfalls nicht signifikant. Auch hier könnte die geringe Versuchsanzahl Grund dafür sein. Zudem zeigt sich die signifikante Expressionsvermehrung in der Literatur in Lungengewebe. Es gibt aktuell keine Literatur, welche TNF alpha bezüglich Hyperoxie im Hippocampusgewebe untersucht. Es könnte ebenso sein, dass die Expressionsänderung durch Hyperoxie im Hippocampus nicht so stark ausfällt wie im Lungengewebe.

Durch den Interleukin-6-Knockout in vivo (P28) zeigt sich kein signifikanter Unterschied durch Hyperoxie. Dies könnte ebenfalls, wie bei Interleukin 1 beta, auf einen Interleukin-6 unabhängigen Signalweg hindeuten.

Bei den folgenden Proteinen **STAT3** und **Iba1** finden sich keine Vorversuche in der Literatur. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche entsprechen den erwarteten Veränderungen.

**STAT 3** induziert Akute-Phasen-Proteine und stimuliert B-Zellen und Monozytendifferenzierung (Levy & Lee 2002). Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass STAT3 durch Hyperoxie vermehrt exprimiert wird. In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich eine tendenziell vermehrte Expression von STAT3 durch Hyperoxie in vivo (P28), welche aber nicht signifikant ist. Dies entspricht der erwartbaren Veränderung. Auch im Vergleich des phosphoryliertem STAT mit unphosphoryliertem STAT zeigt sich eine vermehrte Expression unter Hyperoxie. Dies könnte für eine vermehrte Aktivierung von STAT sprechen.

Durch den Interleukin-6-Knockout zeigt sich bei Hyperoxie keine vermehrte Expression von STAT3 im Vergleich zur Wildtypgruppe. Ein möglicher Grund spiegelt sich im JAK-/STAT-Signalweg wieder. Durch den Mangel an STAT3 kommt es zu keiner Aktivierung des JAK-/STAT-Signalwegs durch die Hyperoxie, was keine vermehrte Expression von STAT zur Folge hat. Im Vergleich des phosphoryliertem STAT mit unphosphoryliertem STAT zeigt sich jedoch dennoch eine vermehrte Expression von phosphoryliertem STAT unter Hyperoxie. Eigentlich wäre dies auf Grund der Stimulation der Phosphorylierung durch Interleukin 6 nicht zu erwarten, könnte jedoch auf Verbindungen zu anderen Signalwegen hinweisen.

Bei **Iba 1** zeigt sich ebenfalls eine tendenziell leicht vermehrte Expression durch Hyperoxie in vivo (P28). Die Ergebnisse sind aber nicht signifikant. Dies entspricht der zu erwartenden Veränderung. Literaturangaben zu der Expression von Iba 1 bei Hyperoxie finden sich ebenfalls nicht. Da Iba 1 aber die Funktion von Mikroglia reguliert (Ito et al. 1998), wäre ein Anstieg bei Hyperoxie zu erwarten.

Durch den Interleukin-6-Knockout in vivo (P28) zeigt sich kein signifikanter Unterschied durch Hyperoxie. Dies könnte auf einen Interleukin-6 unabhängigen Signalweg hindeuten.

Bei dem letzten beiden Proteinen **SOCS 3** und **GFAP** zeigen sich Unterschiede in den zu erwartenden Ergebnissen bzw. den Ergebnissen aus der Literatur und den Ergebnissen der hier durchgeführten Versuche.

**SOCS3** als Inhibitor des Cytokin- beziehungsweise des JAK/STAT-Signalwegs (Croker et al. 2003), könnte durch Hyperoxie eine vermehrte Expression zeigen, da es zu einer Cytokinausschüttung und damit zur Stimulation des negativen Feedbackmechanismus kommt. In der Literatur sind allerdings keine Vorversuche beschrieben. In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich keine Veränderung durch Hyperoxie in vivo (P28). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es weitere Signalwege gibt, bei denen eine zu hohe Induktion von SOCS3 und damit Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs gehemmt wird. Sobah et al. beschreiben zwar eine Induktion von SOCS 3 durch aktivierte STATs, aber zudem auch einen Einfluss von anderen Transkriptionsfaktoren und eine Hemmung durch Growth factor independence-1 (GFI-1) (Sobah, Liongue & Ward 2021). Jegalian et al. zeigen in Versuchen die Hemmung von SOCS3 durch GFI-1 beta und vermuten, dass es noch weitere Mechanismen gibt, die SOCS3 hemmen (Jegalian & H. Wu 2002). Somit wären weitergehende Versuche interessant, um zu bestätigen, dass es zu keinem erwartbaren Anstieg der Expression von SOCS3 unter Hyperoxie kommt und ob mögliche Hemmmechanismen von SOCS3 durch Hyperoxie induziert werden. Ein weiterer erklärender Punkt wäre die beschriebene kurze Lebenszeit von SOCS3 (Sobah, Liongue & Ward 2021). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Proteinexpression von SOCS3 vor der Analyse bereits wieder gesunken ist.

Durch den Interleukin-6-Knockout zeigt sich in Normoxie eine tendenziell vermehrte Expression von SOCS3. Dies könnte ebenfalls für den Einfluss und die Induktion von weiteren Transkriptionsfaktoren auf SOCS3 sprechen (Sobah, Liongue & Ward 2021). In der IL-6-Knockout-Gruppe unter Hyperoxie zeigt sich wiederum kein Unterschied zum Wildtyp. Dies wäre ebenfalls möglich, wenn hemmende Signalmechanismen wie im Wildtyp durch Hyperoxie stimuliert werden.

Bei **GFAP** zeigt sich in der Literatur keine Veränderung durch Hyperoxie in der Retina (Lewis et al. 2004). In den hier durchgeführten Versuche zeigt sich eine tendenziell vermehrte Expression von GFAP durch Hyperoxie in vivo (P28), welche aber nicht signifikant ist. Dies könnte durch die unterschiedlichen Gewebestrukturen von Retina und Hippocampus erklärt werden.

Durch den Interleukin-6-Knockout zeigt sich eine verringerte Expression von GFAP durch Hyperoxie. GFAP ist als Teil des JAK-STAT-Signalwegs abhängig von Interleukin 6 (Cattaneo, Conti & De-Fraja 1999). Auch durch vermehrte Inflammation durch Hyperoxie kommt es durch den Knockout zu keinen erhöhten Interleukin-6-Konzentrationen, sodass die Signaltransduktion und Induktion von GFAP unterbunden wird. Dies könnte eine möglicher Erklärungsansatz der geringeren Expression in vivo sein.

## **5.2 Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Wachstumssignalwege**

Die durchgeführten Versuche zeigen teils Abweichungen von den Ergebnissen aus der Literatur. Insbesondere bei PCNA zeigt sich eine unerwartete, erhöhte Expression bei Hyperoxie. Besonders hervorzuheben sind aber auch die signifikanten Ergebnisse der erhöhten Expression von p21 und Doublecortin, welche sich bisher in der Literatur ohne Vorversuche zeigten. Durch die Interleukin-6-Blockade zeigen sich ebenfalls einige signifikante Veränderungen.

Tabelle 12: Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Wachstumssignalwege

	Literatur HYX	Versuche HYX	Versuche IL6-/-
BDNF	verringert	kein Unterschied	erhöhte Expression bei NOX
GDNF	erhöht	(verringert)	(geringere Expression bei HYX)
CNTF	kein Unterschied	kein Unterschied	(kein Unterschied zu WT)
VEGF	erhöht	(erhöht)	erhöhte Expression bei HYX
PCNA	verringert	erhöht	(kein Unterschied zu WT)
p21	erhöht	erhöht	(kein Unterschied zu WT)
Doublecortin	(zu erwarten: verringert)	erhöht	(kein Unterschied bei HYX)
Erk	verringert	(erhöht) (Zk: verringert (24 & 72h))	erhöht bei HYX (Zk: verringert (24h))
Akt	verringert	(verringert) (Zk: erhöht nach 48h)	erhöht bei NOX (Zk: erhöht nach 48h)
MTT	(zu erwarten: verringert)	(verringert)	kein Unterschied zu WT

Tabelle 12 zeigt die Zusammenfassung der Auswirkungen von Hyperoxie und Interleukin-6-Knockout auf die Wachstumssignalwege. Die eingeklammerten Veränderungen sind nicht signifikant. Zk zeigt die Ergebnisse in der Zellkultur.

In den durchgeführten Versuchen entsprechen die zwei Ergebnisse von **p21** und **CNTF** den Ergebnissen der Literatur.

**p21** zeigt in der Literatur eine erhöhte Expression bei Hyperoxie (Helt et al. 2004). Dies zeigt sich ebenfalls bei den hier durchgeführten Versuchen in vivo (P28). Es zeigt sich eine signifikante Induktion der p21-Expression durch Hyperoxie.

Durch den Interleukin-6-Knockout zeigt sich eine erhöhte Expression von p21 im Vergleich zum Wildtyp, insbesondere bei Hyperoxie. Dies könnte dafür sprechen, dass es durch den Mangel an Interleukin 6 zu einer vermehrten DNA-Inhibition kommt. Perlman et al. zeigen in ihrer Publikation, dass die Expression von p21 in Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis um 40-60 % geringer ist. Im Mausmodell, in dem eine p21-defiziente Maus verwendet wird, zeigt sich eine stark erhöhte Expression von Interleukin 6. Bei einer vermehrten Expression von p21 zeigt sich eine verminderte Expression von Interleukin 6 (H. Perlman et al. 2003). Dies zeigt eine enge Verbindung der beiden Gene und Signalwege und unterstreicht die Bedeutung der erhöhten Expression von p21 im Interleukin-6-Knockout-Modell, insbesondere unter Stressbedingungen wie unter Hyperoxie.

Bei **CNTF** zeigt sich in der Literatur in der Retina keine Veränderung der Expression durch Hyperoxie (Bowers et al. 2001). Die hier durchgeführten Versuche in vivo (P28) zeigen ebenfalls keinen Unterschied durch Hyperoxie, sowohl in den Wildtyp-, als auch in den Interleukin 6 Knockout-Gruppen. Dies spricht dafür, dass sowohl Interleukin 6, als auch Hyperoxie keine Auswirkungen auf die Signaltransduktion von CNTF haben.

In den durchgeführten Versuchen zeigen sich zwei Ergebnisse von **VEGF** und dem **MTT-Assay**, welche den Er-

gebnissen der Literatur entsprechen, aber nicht signifikant sind, oder bei denen die untersuchte Veränderung erwartbar ist, es aber keine Vorversuche in der Literatur gibt.

Bei **VEGF** zeigt sich in der Literatur eine vermehrte Expression durch Hyperoxie in der Zellkultur eines Lungenkarzinoms (Shenberger et al. 2007). Auch in den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich eine vermehrte Expression durch Hyperoxie in vivo (P28), welche aber nicht signifikant ist. Dies könnte durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau begründet sein. Shenberger et al. verwenden A549-Zellen, welche aus einem Adenokarzinom stammen (Shenberger et al. 2007). Die hier durchgeführten Versuche in vivo sind am Hippocampusgewebe durchgeführt worden. Unterschiede könnten durch die unterschiedlichen Organe, oder durch die verschiedenen Zellarten zustande kommen.

Durch den Interleukin-6-Knockout in vivo (P28) zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression bei Hyperoxie im Vergleich zur Interleukin-6-Knockout Normoxie und den Wildtyp-Gruppen. Dies deutet auf eine Verstärkung des Endothelwachstums durch die IL-6-Blockade hin. Auch Interleukin 6 selbst kann eine Endothelproliferation über membrangebundene Interleukin-6-Rezeptoren fördern (Scheller et al. 2011), welches bei der Blockade von Interleukin 6 vermehrt von anderen Signalkaskaden übernommen werden könnte. Dies wäre ein möglicher Ansatzpunkt für eine medikamentöse Therapie eines Interleukin-6-Inhibitors zur Förderung des Endothelwachstums bei Hyperoxie.

Durch das **MTT-Assay** wird die Proliferation dargestellt. Vermutlich wäre eine verringerte Proliferation durch Hyperoxie zu erwarten. Dies würde auch die oben genannte vermehrte Expression von p21 unterstreichen. Vorversuche in der Literatur sind nicht vorhanden. In den hier durchgeführten Versuchen in vitro (HT22) zeigt sich eine Zunahme der Proliferation von 24 bis 72h unter Normoxie-Bedingungen. Es zeigt sich zudem eine Abnahme der Proliferation unter Hyperoxie-Bedingungen. Dies unterstreicht die Vermutung, dass Hyperoxie die Neuroproliferation hemmt.

Ein Gen zeigt in den durchgeführten Versuchen keinen Unterschied durch Hyperoxie, obwohl in den Ergebnissen der Literatur Veränderungen beschrieben sind, beziehungsweise Veränderungen zu erwarten wären.

**BDNF** zeigt in der Literatur eine akute Verminderung der Expression nach sechs Stunden Hyperoxie in Gehirnen von neugeborenen Ratten (Terraneo & Samaja 2017). In den hier durchgeführten Versuchen zeigen sich keine Unterschiede auf die Expression von BDNF durch Hyperoxie in vivo (P28). Ein möglicher Grund dafür wären unterschiedliche Spezies der Versuchstiere. Aber auch in Versuchen von Sengoku et al. zeigt sich eine verminderte Expression im präfrontalen Cortex durch Hyperoxie. Allerdings zeigt sich im Isocortex eine vermehrte Expression (Sengoku, Murray & Wilson 2016). Demnach zeigt sich eine unterschiedliche Expression unter Hyperoxie in den verschiedenen Gehirnteilen. Möglich wäre es somit, dass es im Hippocampus zu einer gleichbleibenden Expression bei Hyperoxie kommt.

In der Interleukin 6- Knockout-Gruppe zeigt sich eine vermehrte Expression von BDNF in der Normoxie-Gruppe, welche signifikant gegenüber den Wildtyp-Gruppen ist. Dies könnte auf eine Induktion von Überlebenssignalwegen durch die Inhibition von IL6 hindeuten. Die Expression von BDNF zeigt sich unter Hyperoxie wieder vermindert, allerdings nicht signifikant. Dies würde den zu erwartenden Ergebnissen der Literatur entsprechen.

In den durchgeführten Versuchen zeigen sich fünf Ergebnisse von **GDNF**, **PCNA**, **Doublecortin**, **Erk** und **Akt**, welche den Ergebnissen der Literatur bzw. den zu erwartenden Ergebnissen nicht entsprechen.

**GDNF** zeigt in der Literatur eine erhöhte Expression unter Hyperoxie (Sengoku, Murray & Wilson 2016). In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich allerdings eine nicht signifikante verminderte Expression unter Hyperoxie in der Wildtyp-Gruppe in vivo (P28). Andere Versuche zeigen eine unveränderte Expression von GDNF durch Hyperoxie im Glomus caroticum (Dmitrieff et al. 2011). Dies deutet auf eine unterschiedliche Expression von GDNF in verschiedenen Geweben hin. Ein möglicher Grund für die Abweichung von den Literaturergebnissen könnte demnach der Unterschied von Hippocampusgewebe und Gewebe aus dem präfrontalem Cortex und Isocortex (Sengoku, Murray & Wilson 2016) sein.

Durch den Knockout von Interleukin 6 zeigt sich bei Hyperoxie eine signifikant verminderte Expression von GDNF. Gadad et al. zeigen den Zusammenhang von hohen Interleukin 6- Konzentrationen und einer erhöhten Expression von GDNF bezüglich affektiver Störungen und Suizidalität (Gadad et al. 2021). Dies würde die verringerte Expression bei Interleukin 6-Mangel erklären. Allerdings zeigt sich in der Knockout-Normoxie-Gruppe eine ähnlich hohe Expression von GDNF wie in der Wildtyp-Normoxie-Gruppe. Möller et al. zeigen in ihren Versuchen, dass neuronale Zellen durch verschiedene Stimuli sowohl GDNF, als auch Interleukin 6 freisetzen (Möller et al. 2006). Das Versuchsergebnis könnte also für eine gleichermaßen ausgeprägte Expression von GDNF und Interleukin 6 sprechen. Allerdings ist in den Versuchen nicht gezeigt, dass ein Knockout bzw. Nichtvorhandensein des einen Gens die Expression des anderen Gens vermindert. Es sind daher weitergehende Versuche vonnöten, um das Verhalten von GDNF unter Interleukin-6-Blockade und Hyperoxie weiter zu untersuchen.

Bei **PCNA** zeigt sich in der Literatur eine verminderte Expression bei Hyperoxie (Gehen et al. 2007). In den hier durchgeführten Versuchen in vivo (P28) zeigt sich allerdings eine signifikante vermehrte Expression von PCNA durch Hyperoxie. Gehen et al. nutzen für ihre Versuche sowohl Lungenzellen von Mäusen, als auch Adenokarzinomzellen vom Menschen. Hier zeigt sich ein möglicher Grund für die Differenz, da es sich um verschiedene Organe und deren Gewebe handelt. In Versuchen von Cai et al. zeigt sich eine verminderte Expression von PCNA bei Hyperoxie in Lungenfibroblasten von Ratten (Cai, Sun & Li 2014). Auch ein Versuch von Ozdemir et al. zeigt eine Abnahme von PCNA-positiven Zellen aus weißer Substanz, corticaler Regionen und Thalamus von Ratten bei Hyperoxie (Ozdemir et al. 2019). Der Versuch von Ozdemir et al. untersucht allerdings andere Gewebe als der Hippocampus bei diesem durchgeführten Versuch. Diese Ergebnisse sollten die Wiederholung der Versuche mit einer größeren Anzahl indizieren, um weitergehend zu untersuchen, ob es wirklich zu einer erhöhten PCNA-Expression in vivo (P28) im Hippocampus von Mäusen kommt, oder die Versuchsergebnisse nicht reproduziert werden können.

Der Knockout von Interleukin 6 induziert eine leicht verminderte Induktion der PCNA-Expression in vivo (P28) bei Hyperoxie, sodass sich die Unterschiede nicht mehr als signifikant darstellen. Dies deutet auf einen Interleukin 6 unabhängigen Signalweg hin.

**Doublecortin** zeigt sich in der Literatur ohne Vorversuche zu der Reaktion auf Hyperoxie. Auf Grund der Förderung der Neurogenese ist davon auszugehen, dass die Expression unter hyperoxischen Umständen verringert

ist (Horesh et al. 1999). Die durchgeführten Versuche in vivo (P28) zeigen allerdings eine signifikant vermehrte Expression von Doublecortin unter Hyperoxie. Klein et al. zeigen in ihren Versuchen eine verminderte Expression von Doublecortin im Hippocampus von Menschen und Hamstern bei Infektionen am Beispiel von Covid-19 (Klein et al. 2021), welches dem vermuteten Ergebnis entspricht. Zu bedenken wäre bei dem Vergleich der Ergebnisse mit den hier durchgeführten Versuchen, dass es sich um keine Infektion handelt, sondern um die Auswirkungen von Hyperoxie. Dies könnte den Unterschied zwischen den Versuchen erklären. Weiterführende Versuche zur Abklärung der erhöhten Expression bei den hier durchgeführten Versuchen in vivo sind unerlässlich.

In der Interleukin-6-Knockout-Gruppe zeigt sich keine erhöhte Expression von Doublecortin unter Hyperoxie in vivo (P28). Versuche von Bobbo et al. zeigen, dass in übergewichtigen Mäusen Interleukin 6 eine leicht erhöhte Expression von Doublecortin begünstigt (Bobbo et al. 2021). Wenn ein Mangel von Interleukin 6 entsprechend die Expression von Doublecortin vermindern würde, wäre dies eine Erklärung für die Ergebnisse, wobei das Expressionslevel von Doublecortin dem Level der Wildtyp-Gruppen ähnelt, was unter der Hypothese erniedrigt sein müsste.

Bei **pErk** zeigt sich in der Literatur eine verringerte Expression bei Hyperoxie (Terraneo & Samaja 2017). In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich allerdings eine leicht vermehrte Expression von pErk unter Hyperoxie in vivo (P28). Felderhoff-Mueser et al. zeigen in ihren Versuchen am Thalamus der Maus eine verringerte Expression von pErk unter Hyperoxie mit einem maximalen Punkt von 12h. Die Expression von Erk zeigte sich in diesen Versuchen unverändert (Felderhoff-Mueser, Bittigau et al. 2004). Die Unterschiede zu den hier durchgeführten Versuchen könnten darin begründet sein, dass es sich sowohl um ein anderes Gewebe (Thalamus vs. Hippocampus), als auch um einen anderen Zeitpunkt (12h vs. 28d) handelt. Somit könnte es zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Nyunoya et al. zeigen in ihren Versuchen mit Makrophagen eine Erk-Aktivierung unter Hyperoxie, ohne Konzentrationsänderung vom Gesamt-Erk (Nyunoya et al. 2005). In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich eine niedrigbleibende Expression von pErk im Vergleich zu Erk, was keine Aktivierung widerspiegelt. Diese Unterschiede könnten durch den Vergleich von Makrophagen mit dem gemischten Gewebe aus solidem Gewebe wie hier dem Hippocampus bedingt sein.

In der Interleukin-6-Knockout-Gruppe zeigt sich eine signifikant vermehrte Expression von Erk unter Hyperoxie. Auch die Expression von Erk in Normoxie ist vermehrt, aber nicht signifikant. Erk ist ein direkter Bestandteil des Signalwegs von Interleukin 6, welches bei der Interleukin-6-Blockade durch andere Signalwege überexprimiert werden könnte (Yun et al. 2018).

Hier liegt ein möglicher Ansatzpunkt zur medikamentösen Therapie. Durch eine Interleukin-6-Blockade könnte die Stimulation von Zellüberleben und -differenzierung und Förderung von Neuronenplastizität (Grewal, York & Stork 1999) durch erhöhte Expression von Erk, insbesondere unter Hyperoxie, gefördert werden.

In den Zellkulturversuchen (in vitro) zeigt sich ein vermindertes Expressionslevel von Erk in den Hyperoxie-Gruppen nach 24h, nach 48h gleicht sich dieser Unterschied wieder an. Diese Ergebnisse sind nicht signifikant, entsprechen aber den Ergebnissen von Felderhoff-Mueser et al., wobei der dort maximale Unterschied nach 12h in dem hier durchgeführten Versuchsaufbau nicht untersucht wurde (Felderhoff-Mueser, Bittigau et al. 2004). Durch die Interleukin-6-neutralisierenden Antikörper kommt es zu keiner Änderung. Dies könnte darin begründet sein, dass die in vivo gesehene Überexpression durch andere Signalwege noch nicht bis zum Zeitpunkt von 72h erfolgt ist.

**Akt** zeigt in der Literatur eine verminderte Expression und Phosphorylierung unter Hyperoxie (Terraneo & Samaja 2017). Die hier durchgeführten Versuche in vivo (P28) zeigen ebenfalls eine tendenziell verminderte Expression von pAkt unter Hyperoxie, welche aber nicht signifikant ist. Nyunoya et al. beschreiben in ihren Versuchen mit Makrophagen keine Veränderung der Akt-Expression unter Hyperoxie (Nyunoya et al. 2005). Die Interleukin-6-Knockout-Gruppe zeigt insgesamt ein höheres Akt-Expressionslevel, aber ebenfalls eine verminderte Expression unter Hyperoxie. Die hier durchgeführten Versuche zeigen also eine Mischung aus den beiden Literaturangaben. Dies könnte durch die unterschiedlichen Gewebe bedingt sein. Da Akt, ebenso wie Erk, Bestandteil des Signalwegs von Interleukin 6 ist, könnte es wie bei Erk zu einer Überexpression durch andere Signalwege bei Interleukin-6-Knockout kommen (Nishikai-Yan Shen et al. 2017).

In den Zellkulturversuchen (in vitro) zeigt sich ein erhöhtes Expressionslevel von Akt in den Hyperoxie-Gruppen nach 48h, nach 72h gleicht sich dieser Unterschied wieder an. Diese Ergebnisse sind ebenfalls nicht signifikant. Im Vergleich dazu zeigen Versuche von Felderhoff-Mueser et al. am Thalamus der Maus eine verringerte Expression von pAkt unter Hyperoxie mit einem maximalen Punkt von 12h. Die Expression von Akt zeigte sich in diesen Versuchen unverändert (Felderhoff-Mueser, Bittigau et al. 2004). Ahmad et al. zeigen in ihren Versuchen an Lungenendothelzellen eine vermehrte Expression von pAkt durch Hyperoxie nach 60 Minuten bis 48 Stunden (Ahmad et al. 2006). Dies zeigt vermutlich erneut die unterschiedlichen Auswirkungen auf verschiedene Gewebe (hier zwischen HT-22-Neuronen und dem Thalamus).

Auch hier liegt ein möglicher Ansatzpunkt zur medikamentösen Therapie. Durch eine Interleukin-6-Blockade könnte die Stimulation von Zellüberleben, Zellzyklus, Proliferation, Transkription, Migration und Metabolismus (Fayard et al. 2005, Brazil & Hemmings 2001) durch erhöhte Expression von Akt, insbesondere unter Hyperoxie, gefördert werden.

### 5.3 Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Apoptose

Die durchgeführten Versuche zeigen keine signifikanten Veränderungen durch Hyperoxie auf Apoptose. Besonders hervorzuheben sind die fehlenden Veränderungen von Bcl2 bei Hyperoxie. Auch durch die Interleukin-6-Blockade zeigen sich keine signifikanten Veränderungen.

Tabelle 13: Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Apoptose

	Literatur HYX	Versuche HYX	Versuche IL6 -/-
BAX	erhöht	kein Unterschied	(kein Unterschied zu WT)
Bcl2	erhöht 60% O <sub>2</sub> verringert 90% O <sub>2</sub>	kein Unterschied	(kein Unterschied zu WT)
Caspase	erhöht	kein Unterschied	(kein Unterschied zu WT)

Tabelle 13 zeigt die Zusammenfassung der Auswirkungen von Hyperoxie und Interleukin-6-Knockout auf die Apoptose. Die eingeklammerten Veränderungen sind nicht signifikant.

Bei **BAX** zeigt sich in der Literatur eine erhöhte Expression in Rattenlungen bei Hyperoxie nach 3 und 14 Ta-

gen. Die erhöhte Expression von BAX zeigt sich allerdings nicht nach 7 Tagen (Husari et al. 2006). In den hier durchgeführten Versuchen in vivo (P28) zeigt sich allerdings kein Unterschied unter Hyperoxie. Weitere Versuche zeigen sowohl ein erhöhtes BAX/Bcl2-Ratio im Myokardgewebe von sieben Wochen alten Mäusen nach 28 Tagen Hyperoxie (Gyongyosi et al. 2018), als auch in cerebralen Kerngebieten von 3-5 Tage alten Schweinen (Chang et al. 2007). Auf der anderen Seite spiegelt der Versuche von Husari et al. eine Schwankung je nach Dauer der Hyperoxie wieder. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten demnach an der Dauer der Hyperoxie, bzw. im Vergleich zu Gyongyosi et al. an dem Alter der Versuchstiere liegen. Weiterführende Versuche zur Abklärung sind vonnöten.

**Bcl 2** zeigt in milder Hyperoxie (60% Sauerstoff) in der Literatur eine vermehrte Expression, bei starker Hyperoxie (95% Sauerstoff) eine verminderte Expression von Bcl2 (Sheikh et al. 2010). In den hier durchgeführten Versuchen zeigen sich keine Unterschiede durch Hyperoxie in vivo (P28). Die hier durchgeführten Versuche wurden allerdings bei 85% Sauerstoff durchgeführt. Es könnte sein, dass es bei 85% Sauerstoff zu dem Übergang von vermehrter Expression bei 60% Sauerstoff und verminderter Expression bei 95% Sauerstoff kommt und es keinen Unterschied in der Expression gibt.

Bei **Caspase** zeigt sich eine vermehrte Aktivität bei Hyperoxie in der Literatur (Dieperink, Blackwell & Prince 2006). Auch bei Versuchen von Dapaah-Siakwan et al. zeigen sich verminderte Schäden von Lunge und Gehirn bei Hyperoxie, wenn es zu einer Caspase-Blockade kommt (Dapaah-Siakwan et al. 2019). Die hier durchgeführten Versuche in der Zellkultur, in vitro (HT22), zeigen eine gleichbleibende Caspase-Aktivität aller Gruppen, welche ab 48h zunimmt. Dies könnte möglicherweise durch die sowohl proapoptischen als aber auch durch die proinflammatorischen Signalkaskaden von Caspase zu erklären sein (Dapaah-Siakwan et al. 2019). Dieperink et al. nutzen für ihre Versuche Lungenmesenchymzellen (Dieperink, Blackwell & Prince 2006) und auch bei Versuchen von De Bels et al. mit Leukämiezellen zeigte sich eine vermehrte Aktivität von Caspase unter Hyperoxie (De Bels et al. 2020). Eine vermehrte Aktivität unter Hyperoxie zeigt sich in den hier durchgeführten Versuchen nicht, welche aber in der Literatur beschrieben ist. Der Unterschied zu den hier durchgeführten Versuchen könnten auch auf die unterschiedlichen Zellarten bzw. der Vergleich von Gewebe zu Zellen zurückzuführen sein. Auch hier sollten weitere Versuche, sowohl in vivo als auch in vitro, durchgeführt werden.

Auch durch die Interleukin-6-Blockade zeigen sich keine signifikanten Veränderungen in vivo (P28) bei der Expression von BAX und Bcl2 und in vitro (HT22) bei der Aktivität von Caspase. Die proapoptische Funktion von Interleukin 6 (Scheller et al. 2011) könnte durch andere Signalkaskaden ersetzt worden sein.

## 5.4 Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Plastizität

Die durchgeführten Versuche zeigen größtenteils die zu erwartenden Veränderungen, wenn auch nicht signifikant, durch Hyperoxie auf Plastizität. Besonders hervorzuheben sind die signifikanten Ergebnisse der längeren Ausläufer beim neurite outgrowth Assay und die signifikante Induktion von Synapsin in der Zellkultur-Immunologie bis 48h. Durch die Interleukin-6-Blockade zeigen sich ebenfalls einige signifikante Veränderungen.

Tabelle 14: Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Plastizität

	Literatur HYX	Versuche HYX	Versuche IL6 -/-
cfos	(zu erwarten: verringert)	(verringert) (Zk: erhöht)	(kein Unterschied zu WT) (Zk: kein Unterschied zu CO)
CAMKII	kein Unterschied	kein Unterschied	geringere Expression bei HYX
Synapsin	(zu erwarten: verringert)	kein Unterschied	erhöhte Expression HYX
Synapsin-Immunologie		erhöht bis 48h	(keine Erhöhung wie bei CO)
GAP 43	(zu erwarten: erhöht)	kein Unterschied	erhöhte Expression HYX
Neurite outgrowth	(zu erwarten: länger)	längere Ausläufer	(kein Unterschied zu CO)

In Tabelle 14 wird die Zusammenfassung der Auswirkungen von Hyperoxie und Interleukin-6-Knockout auf die Plastizität dargestellt. Die eingeklammerten Veränderungen sind nicht signifikant. Zk zeigt die Ergebnisse in der Zellkultur.

**CAMKII** zeigt in Hyperoxie in fetalen Kardiomyozyten von Hühnern (in vitro) keinen Unterschied der Expression (Greco & Gomez 2014). Auch in den hier durchgeführten Versuchen (in vivo P28) zeigt sich kein Unterschied der Expression durch Hyperoxie.

Durch den Interleukin-6-Knockout zeigt sich allerdings eine, teils signifikante, verringerte Expression. Versuche von O'Brien et al. zeigen eine Verbindung zwischen CAMKII und Interleukin 6. In den Versuchen von O'Brien et al. zeigt sich bei einer erhöhten Konzentration von Interleukin 6 eine vermehrte Expression von CAMKII (O'Brien et al. 2021). In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich nun eine mögliche umgekehrte Abhängigkeit von CAMKII und Interleukin 6, welches die Annahme einer Verbindung von O'Brien et al. unterstreicht.

Der Vergleich von phosphoryliertem CAMKII und gesamtem CAMKII zeigt keine signifikanten Unterschiede. Dies deutet auf keine Aktivierung von CAMKII durch Hyperoxie oder den Interleukin-6-Knockout hin. Diese fehlenden Unterschiede finden sich auch in der Literatur bei Greco et al. (Greco & Gomez 2014).

Bei dem folgendem Gen **cfos** und dem **neurite outgrowth Assay** gibt es keine Vorversuche in der Literatur. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche entsprechen den erwarteten Veränderungen, sind aber nur teilweise signifikant.

Bei **cfos** zeigt sich in den hier durchgeführten Versuchen eine nicht signifikante Verringerung der Expression unter Hyperoxie in vivo (P28). Durch die Förderung der Neuronenaktivierung und der zellkulären Umstrukturierung wäre eine verminderte Expression unter Hyperoxie zu erwarten (Kovács 1998).

In der Interleukin-6-Knockout-Gruppe zeigt sich kein Unterschied zum Wildtyp in vivo (P28). Cfos scheint hier über andere Signalkaskaden, unabhängig von Interleukin 6, zu wirken.

In den Zellkulturversuchen (in vitro) zeigt sich ein erhöhtes Expressionslevel von cfos, wenn auch nicht signifikant, unter Hyperoxie. Die erhöhte Expression zeigt sich zu allen Zeitpunkten (24, 48 und 72h) ohne eine Dynamik zwischen den Zeitpunkten. Dies könnte zeigen, dass es zu einer initialen Überexpression von Faktoren für die Neuronenaktivierung kommt, welche nach weiteren Tagen (P28) dann zu einer verminderten Expression führt. Auch könnten unterschiedliche Auswirkungen von Hyperoxie auf isolierte Neuronen und Hippocampusgewebe der Grund für die unterschiedliche Reaktion auf Hyperoxie sein.

Durch die Interleukin-6-neutralisierenden Antikörper kommt es zu keiner Änderung. Dies könnte die oben getroffene Annahme bestärken, dass cfos unabhängig von Interleukin 6 interagiert.

Im **neurite-outgrowth Assay** in vitro zeigen sich signifikant längere Neuronenausläufer bei Hyperoxie. Dies könnte durch die geförderte Apoptose und daher geringere Neuronenzahl pro Fläche begründet sein. Unter dem Mikroskop erkennt man deutlich weniger Zellen mit längeren Ausläufern zu der nächsten Zelle. Zusätzlich zeigt sich eine signifikant verringerte Länge der Ausläufer durch die Interleukin-6-neutralisierenden Antikörper. Allerdings zeigt sich in den durchgeführten Versuchen bezüglich Apoptose keine Auswirkung durch eine Interleukin-6-Blockade. Ein möglicher Grund wäre, dass es durch eine Reduktion der Inflammation zu einer verringerten Reduktion der Neuronenzahl kommt und demnach nicht so lange Ausläufer vonnöten sind. Weitere Versuche bezüglich der Neuronenausläufer und Apoptose wären demnach wichtig um diese Hypothese weiter zu untersuchen.

Die folgenden Proteine, Gene und Immunfluoreszenz zeigen in den durchgeführten Versuchen größtenteils keinen Unterschied durch Hyperoxie, obwohl Veränderungen zu erwarten gewesen wären. Es zeigen sich auch hier keine Vorversuche in der Literatur unter hyperoxischen Bedingungen im Gehirn.

Bei **Synapsin** zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in vivo (P28) bei Hyperoxie. Durch die Förderung der Mobilisation von synaptischen Vesikeln und der neuronalen Plastizität (Chi, Greengard & Ryan 2001), wäre eine verringerte Expression von Synapsin bei Hyperoxie zu erwarten gewesen. Es wäre allerdings auch möglich, dass die Mobilisation von synaptischen Vesikeln auch in der Stresssituation unter Hyperoxie aufrecht erhalten wird, um die Kommunikation zwischen den Neuronen zu gewährleisten.

In der Interleukin-6-Knockout-Gruppe zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Expression von Synapsin bei Hyperoxie. D'Arcangelo et al. zeigen in ihren Versuchen, dass es durch Interleukin 6 zu einer verringerten Phosphorylierung und damit Aktivierung von Synapsin kommt (D'Arcangelo et al. 2000). Die Schlussfolgerung von D'Arcangelo et al. ist, dass es zu einem protektiven Effekt für das Neuronenüberleben durch Hemmung der Aktivität kommt (D'Arcangelo et al. 2000). Durch die Interleukin-6-Blockade zeigt sich in den hier durchgeführten Versuchen nun ein Anstieg der Expression von Synapsin bei Hyperoxie, da eine mögliche Hemmung durch Interleukin 6 wegfällt. Dies entspricht der Theorie von D'Arcangelo et al. Auch das phosphorylierte Synapsin zeigt sich in der Interleukin-6-Knockout-Gruppe während der Normoxie im Vergleich zum Wildtyp minimal erhöht, was ebenso zu der Theorie von D'Arcangelo passt.

In der immunologischen Färbung von Synapsin in vitro zeigt sich nach 24h eine signifikante Induktion der Expression von Synapsin bei der Hyperoxie-Kontroll-Gruppe. Die Hyperoxie-IL6nAK-Gruppe zeigt wiederum eine niedrigere Expression von Synapsin im Vergleich zur Hyperoxie-Kontroll-Gruppe. Dies zeigt im Vergleich zu den in-vivo Untersuchungen umgekehrte Ergebnisse. Hier zeigt sich durch die Interleukin-6-Blockade eine verminderte Expression von Synapsin bei Hyperoxie im Vergleich zur Hyperoxie-Kontroll-Gruppe. Der Unterschied der Gruppen nimmt bis 48h ab und bei 72h zeigt sich kein Unterschied mehr in der Expression von Synapsin. Dies könnte für eine initiale Mobilisierung der synaptischen Vesikel durch Hyperoxie sprechen (Chi, Greengard & Ryan 2001), bevor die Expression der Gruppen gleichbleibend ist. Bei der Interleukin-6-Blockade zeigt sich dieses initiale Phänomen allerdings nicht. Eine Abklärung durch weitere Versuche könnte diese Widersprüche beseitigen.

**GAP 43** zeigt in den durchgeführten Versuchen in vivo (P28) keinen Unterschied durch Hyperoxie im Wildtyp. In der Literatur zeigt sich eine erhöhte Expression von GAP 43 in der Retina unter hyperoxischen Bedingungen (Chung et al. 2010). Literatur zu anderen Gehirngeweben finden sich nicht. Die erhöhte Expression von GAP 43 durch Hyperoxie könnte auch mit den Ergebnissen des neurite-outgrowth Assay begründet werden. Hier zeigen sich verlängerte Ausläufer durch Hyperoxie. Dies könnte durch GAP 43, welches das Wachstum von Axonen begünstigt, bedingt sein (Benowitz & Routtenberg 1997). Diese Ergebnisse spiegeln sich aber nicht in den durchgeführten Versuchen in vivo wieder, könnten aber auch durch die längere Auswirkung der Hyperoxie bedingt sein.

In der Interleukin-6-Knockout-Gruppe zeigt sich eine signifikant vermehrte Expression in der Hyperoxie-Gruppe. Hakkoum et al. zeigen in ihren Versuchen, dass es zu einer vermehrten Expression von GAP 43 bei einer höheren Konzentration von Interleukin 6 kommt (Hakkoum, Stoppini & Muller 2007). In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich dies nicht. Hier zeigt sich eine gleichbleibende Expression durch die Interleukin-6-Blockade bei Normoxie im Vergleich zum Wildtyp. Erst bei Hyperoxie zeigt sich eine vermehrte Expression von GAP 43. Die Versuche von Hakkoum et al. wurden an Hippocampuschnitten der Maus, welche in Kultur über 17 bis 21 Tage gehalten wurden, durchgeführt. Ein möglicher Grund für den Unterschied wäre demnach die verschiedene Aufarbeitung der Materialien. Auch wurden die hier durchgeführten Versuche am Gyrus dentatus des Hippocampus durchgeführt, welches nur ein Bestandteil des gesamten Hippocampus ist. Auch hier sollten weitere Versuche, sowohl in vivo als auch in vitro, durchgeführt werden. In der Interleukin-6-Gruppe zeigt sich nun allerdings der bei Chung et al. beobachtete Anstieg der Expression von GAP 43 bei Hyperoxie (Chung et al. 2010). Dies würde sich ebenfalls wieder mit den Ergebnissen des neurite-outgrowth Assays in Verbindung setzen lassen, wo sich längere Axonen unter Hyperoxie zeigen.

## 5.5 Vergleich der aktuellen Ergebnisse mit den Vordaten

In dem folgenden Kapitel werde ich die Ergebnisse der Vordaten aus 2013 mit den aktuellen Ergebnissen vergleichen.

Als Bestandteil der Gruppe für die Neuroinflammation zeigt sich in den Vordaten (in vivo) eine größtenteils signifikant erhöhte **TNF alpha-mRNA Expression** bis 28 Tage in den Hyperoxie-Gruppen. Bei der Interleukin 6-Blockade zeigt sich kein Unterschied zu den Gruppen ohne Interleukin 6-Blockade.

In den aktuell durchgeführten Versuchen (in vivo) zeigt sich eine nicht signifikante Erhöhung der TNF alpha-mRNA Expression zum Zeitpunkt von 28 Tagen. Durch die Interleukin 6-Blockade zeigt sich wie in den Vordaten kein Unterschied.

Beide Ergebnisse spiegeln die Ergebnisse aus der Literatur wieder (You et al. 2019). In den Vorversuchen zeigen sich sogar signifikante Ergebnisse, welche sich in den hier durchgeführten Versuchen nicht zeigen. Unbekannt ist allerdings die Anzahl der untersuchten Versuchstiere pro Gruppe. Eine unterschiedliche Gruppengröße könnte sich auf die Signifikanz auswirken.

In den Vordaten (in vitro und in vivo) zeigt sich eine größtenteils signifikante Erhöhung der relativen **SOCS3-mRNA-Expression** mit Anstieg über den gesamten Zeitraum in den Hyperoxie-Gruppen. Bei der relativen SOCS3-mRNA-Expression (in vitro) zeigt sich bei 24 und 72h (hier signifikant) eine Abnahme bei der Hyperoxie-Gruppe mit IL6-neutralisierendem Antikörper im Vergleich zu der Hyperoxie-Gruppe ohne Antikörper. Bei 48h zeigt sich ein Anstieg der Expression in der Antikörper-Gruppe.

In den aktuell durchgeführten Versuchen (in vivo) zeigt sich bei der SOCS3-mRNA-Expression, anders als in den Vordaten, kein Unterschied durch Hyperoxie zum Zeitpunkt von 28 Tagen. Durch die Interleukin 6-Blockade zeigt sich eine nicht signifikante vermehrte SOCS3-mRNA-Expression in der Normoxie-Gruppe und eine geringere SOCS3-mRNA-Expression in der Hyperoxie-Gruppe, ähnlich wie in den Vordaten beschrieben.

Die Unterschiede könnten möglicherweise ebenfalls durch unterschiedliche Versuchszahlen bedingt sein. Die Auswirkungen der Interleukin-6-Blockade entsprechen einander, wobei hier in vivo-Versuche mit in-vitro Versuchen verglichen werden.

Stellvertretend für die **Neurotrophine** (Proliferation und Differenzierung) zeigt sich bei **NGF** ein größtenteils signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Expression bis zu 72 Stunden in den Hyperoxie Gruppen der Vorversuche (in vitro). Nach 7 Tagen fällt die relative mRNA-Expression in den Hyperoxie-Gruppen fast auf 0 ab (in vivo und in vitro). Nach 27 Tagen kommt es zu einer signifikant verminderten Expression (in vivo). Mit IL6-neutralisierendem Antikörper zeigt sich in der Hyperoxie-Gruppe ein teils signifikanter Anstieg der mRNA-Expression im Vergleich zu der Gruppe ohne IL6-Blockade.

In den aktuell durchgeführten Versuchen (in vivo) zeigt sich (allerdings bei **BDNF**, ebenfalls zugehörig zu der Gruppe der Neurotrophine), kein Unterschied durch Hyperoxie. Durch die Interleukin 6-Blockade zeigt sich eine erhöhte mRNA-Expression bei Normoxie (signifikant) und eine nicht signifikante geringere mRNA-Expression bei Hyperoxie.

Dies könnte durch den Unterschied von NGF und BDNF bedingt sein, welche möglicherweise nicht gleich auf Stimulie wie Hyperoxie reagieren, obwohl sie derselben Obergruppe zugehören. In der Literatur wird sogar eine verminderte Expression von BDNF beschrieben bei Hyperoxie (Terraneo & Samaja 2017). Taglialatela et al. zeigen in ihren Versuchen, dass es zu einer verminderten Expression von NGF nach 5 Tagen Hyperoxie kommt (Taglialatela, Perez-Polo & Rassin 1998). In den Literaturangaben werden die Versuche allerdings mit Ratten durchgeführt (Terraneo & Samaja 2017, Taglialatela, Perez-Polo & Rassin 1998), in den hier durchgeführten Versuchen wurden Mäuse genutzt. Dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

In den Vordaten (in vivo und in vitro) zeigt sich ein zunehmender Anstieg der relativen **TGF beta-mRNA-Expression** (Fibrose und Remodeling) in den Hyperoxie-Gruppen bis zu 28 Tagen. Mit dem IL6-neutralisierendem Antikörper zeigt sich bei Hyperoxie ein gleichbleibendes mRNA-Expressions-level wie bei der Normoxie-Gruppe (in vitro).

In den aktuell durchgeführten Versuchen zeigt sich ebenfalls eine Induktion der relativen TGF beta-mRNA-Expression durch Hyperoxie. Durch die Interleukin 6-Blockade zeigt sich eine ähnliche Tendenz wie in den Vordaten. Es zeigt sich keine signifikant erhöhte mRNA-Expression bei Hyperoxie.

Der Anstieg der Expression spiegelt sich ebenso in der Literatur wieder (T. Zhang et al. 2019), auch der ausbleibende Anstieg der Expression durch die Interleukin-6-Blockade lässt sich in Versuchen von Shochet et al. wiederfinden und erklären (Epstein Shochet et al. 2020).

In den Vordaten (in vivo und in vitro) zeigt sich ein nicht signifikanter Anstieg der **Caspase-Protein-Expression** in den Hyperoxie-Gruppen nach 24 Stunden, einen nicht signifikanten Abfall nach 48 Stunden und einen weiteren nicht signifikanten Abfall nach 72h auf das 0,25-fache der Normoxie-Gruppen. Nach 7 und 28 Tagen zeigen sich ähnliche Ergebnisse in beiden Gruppen.

In den aktuell durchgeführten Versuchen (in vitro) zeigen sich keine Unterschiede der Caspase-Protein-Expression durch Hyperoxie oder durch Interleukin 6-Blockade.

Der Anstieg der Caspase-Protein-Expression durch Hyperoxie, wie in den Vordaten, zeigt sich ebenso in der Literatur nach 48h (Dieperink, Blackwell & Prince 2006). Der anschließende Abfall der Expression allerdings nicht. Die beschriebenen ähnlichen Expressionslevel nach 7 und 28 Tagen in den Vordaten entsprechen den Ergebnissen der hier durchgeführten Versuche, allerdings schon nach 24-72 Stunden. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass die vermehrte Caspase-Expression in der Literatur nur nach 48h Hyperoxieexposition gemessen wurde. Weitere Zeitpunkte und Dynamiken der Entwicklungen wurden in der Literatur nicht dargestellt.

## 5.6 Kritikpunkt Mausarten

Bei den oben angegebenen Veränderungen der Expressionen im Vergleich zu Vorversuchen in der Literatur müssen gewisse Einschränkungen bezüglich der durchgeführten Versuche bedacht werden.

So fällt auf, dass es sich um zwei verschiedene Populationen von Mäusen handelt, welche die Wildtyp und welche die Knockout-Gruppe stellen. Das heißt, dass der genetische Hintergrund beider Linien nicht identisch ist.

Bei den Wildtyp-Mäusen handelt es sich um die Linie C57BL/6N und bei den Knockout-Mäusen um die Linie B6.129S2-Il6(tm1Kopf/J).

Es wurde bereits erforscht, dass aus verschiedenen Linien wie B6N und B6J deutlich verschiedene Phänotypen resultieren, da es mittlerweile 34 Unterschiede in den Nukleotiden und 15 strukturelle, überschneidende Genvarianten gibt (Kang, Hawkins & Kearney 2019).

Usami et al. zeigen, dass es bei den verschiedenen Linien B6N und B6J zu einer unterschiedlichen Genexpression verschiedener Gene und der Menge der Bildung von Nierenkristallen kommt (Usami et al. 2018).

Yokoyama et al. zeigen zudem, dass es bei den Linien B6N und B6J zu einer unterschiedlichen Gonadenentwicklung kommt. So zeigen B6J-Mäuse in den durchgeführten Versuchen eine signifikant geringe Wahrscheinlichkeit Hoden zu entwickeln (Yokoyama et al. 2019).

Auch Sturm et al. zeigen Auswirkungen der unterschiedlichen Linien auf das Verhalten der Mäuse. So kommt es durch Corticosteroide bei B6N-Mäusen zu einer signifikant vermehrten Futteraufnahme, bei B6J-Mäusen nicht. Auch zeigen sich mehr Auswirkungen von Corticosteroide auf deren Verhalten bei B6N-Mäusen wie Zuckerpräferenz und Schwimmfähigkeit im Vergleich zu den B6J-Mäusen (Sturm et al. 2015).

Die Arbeitsgruppe um Alcazar, von der die Hippocampi der durchgeführten Versuche stammen, nutzt im Vergleich dazu für ihre Versuche ebenfalls die Mausmodelle unterschiedlicher Linien und vergleicht die Ergebnisse untereinander mit dem Darstellen von Effekten (Hirani et al. 2022, Mohr et al. 2019).

Insgesamt ist also daher ein Vergleich der Wildtyp-Gruppe und der Interleukin-6-Knockout-Gruppe unter Vorbehalt zu sehen, da sich die beobachteten Differenzen auch auf die unterschiedliche Herkunft der Mäuse beziehen könnte.

Für eine weitere Aufarbeitung der gefundenen Unterschiede in den Untersuchungen ist es somit unerlässlich, die Versuche mit derselben Mausart erneut durchzuführen, um zu verifizieren, dass der Unterschied nicht durch die verschiedenen Arten bedingt ist.

## **5.7 Kritikpunkt IL-6-Knockout**

Bei den Knockout-Mäusen selbst fällt in Abbildung 13 auf, dass es eine signifikante Induktion der Expression von Interleukin 6 in den beiden Interleukin-6-Knockout Gruppen gibt. Das heißt, dass mehr IL6-mRNA in der Knockout-Gruppe nachgewiesen werden kann, welches nicht dem gewünschten Ergebnis des Knockouts entspricht.

In der Beschreibung der Knockout-Mäuse wird bestätigt, dass in der durchgeführten qPCR keine mRNA von Interleukin 6 nachgewiesen werden konnte. In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich dies allerdings nicht.

Auch bei erneuter Analyse mit einem anderen Interleukin-6-Primer (Abbildung 14), welcher sich für Interleukin-6-Knockout-Mäuse eignet, zeigt sich ebenfalls eine signifikante Induktion der Expression von Interleukin 6.

Mögliche Ursachen wären, dass diese beiden Primer, trotz der Angaben, nicht zur Verwendung bei Knockout-Mäusen geeignet sind, oder es zu einem Fehler beim Knockout selbst gekommen ist.

Sollte es sich herausstellen, dass der Knockout fehlerhaft ist und es zu einer Überexpression von Interleukin 6 kommt, wären sämtliche Ergebnisse der Interleukin-6-Knockoutgruppe gerade auch im Hinblick auf eine medikamentöse Hemmung nicht verwertbar.

Eine erneute Analyse des Knockouts und die Wiederholung der Versuche mit anderen Knockout-Tieren ist somit unerlässlich, um die Ergebnisse zu verifizieren oder zu widerlegen.

## 5.8 Ausblick

Ziel der durchgeführten Arbeit ist es, die Auswirkungen von Hyperoxie auf den Hippocampus im Bezug auf Inflammation, Wachstumssignalwege, Apoptose und Plastizität, zu bestimmen und herauszufinden, ob durch eine Blockade von Interleukin 6 schädliche Folgen durch Hyperoxie vermieden werden können.

Die Versuchsergebnisse entsprechen größtenteils den aus der Literatur zu erwartenden Ergebnissen und eröffnen einige Ansatzpunkte, bei denen die Blockade von Interleukin 6 negative Auswirkungen von bestimmten Genen oder Protein reduzieren kann.

Allerdings liefern die Ergebnisse nur erste Ansatzpunkte und beziehen sich aktuell nur auf den Hippocampus der Maus und immortalisierten Hippocampusneuronen. Inwiefern die Ergebnisse im Menschen reproduzierbar sind, eine Interleukin-6-Blockade langfristige Nebenwirkungen hat, oder ob zum Beispiel langfristige negative Auswirkungen auf andere Organ- oder Zellsysteme zu erwarten sind, bleibt bislang ungeklärt.

Auch zeigen sich zwei große Kritikpunkte mit der Verwendung unterschiedlicher Maustypen und einer fraglichen Auswirkung der Interleukin-6-Blockade durch den eventuell fehlerhaften Knockout. Dementsprechend sollten vor weitergehenden Untersuchungen zunächst die aktuellen Versuche mit angepasstem Versuchsaufbau wiederholt werden.

Zudem wären in weiteren Versuchen mehr Probenzeitpunkte (in vivo und in vitro) interessant, um eine zeitliche Dynamik besser zu bestimmen. Auch wäre es interessant, weitere Gen-/Proteinauswirkungen durch Knockouts oder neutralisierende Antikörper zu betrachten, um weitere medikamentöse Therapieansätze zu erarbeiten.

Universales Ziel weiterer Versuche sollten die exakten Erforschung der Auswirkungen der Hyperoxie sein, um dann durch medikamentöse Hemmung Therapie- und Präventionsansätze zur erarbeiten. Somit könnte in Zukunft eine unbedenkliche Sauerstofftherapie ohne Sorge vor Nebenwirkungen möglich sein.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abreu, José G. et al. (Aug. 2002). „Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta.“ eng. In: *Nature cell biology* 4 (8), S. 599–604.
- Ahmad, Aftab et al. (Apr. 2006). „Endothelial Akt activation by hyperoxia: role in cell survival.“ eng. In: *Free radical biology and medicine* 40 (7), S. 1108–18.
- Akert, K. & P. Hummel (1963). *Anatomie und Physiologie des limbischen Systems*. Grenzach: Hoffmann-La Roche, S. 11. 31 S.
- Anderson, Peter J. & Lex W. Doyle (2006). „Neurodevelopmental Outcome of Bronchopulmonary Dysplasia“. In: *Seminars in Perinatology* 30.4. BPD: State of the Art, S. 227–232. ISSN: 0146-0005.
- Axmacher, Nikolai et al. (Juli 2007). „Sustained neural activity patterns during working memory in the human medial temporal lobe.“ eng. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (29), S. 7807–16.
- Azodi, Shila & Steven Jacobson (Juli 2016). „Cytokine Therapies in Neurological Disease.“ eng. In: *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 13 (3), S. 555–61.
- Barbacid, M. (Sep. 1995). „Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors.“ eng. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 766, S. 442–58.
- Barde, Y. A. (Nov. 1994). „Neurotrophic factors: an evolutionary perspective.“ eng. In: *Journal of neurobiology* 25 (11), S. 1329–33.
- Belardelli, Filippo & Maria Ferrantini (Apr. 2002). „Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity.“ eng. In: *Trends in immunology* 23 (4), S. 201–8.
- Benowitz, L. I. & A. Routtenberg (Feb. 1997). „GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity.“ eng. In: *Trends in neurosciences* 20 (2), S. 84–91.
- Bigdeli, Mohammad Reza et al. (Aug. 2008). „Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF-alpha level.“ eng. In: *Experimental neurology* 212 (2), S. 298–306.
- Boatright, Kelly M. & Guy S. Salvesen (Dez. 2003). „Mechanisms of caspase activation.“ eng. In: *Current opinion in cell biology* 15 (6), S. 725–31.
- Bobbo, Vanessa C. et al. (Aug. 2021). „Interleukin-6 actions in the hypothalamus protects against obesity and is involved in the regulation of neurogenesis.“ eng. In: *Journal of neuroinflammation* 18 (1), S. 192.
- Bowers, F. et al. (März 2001). „Effects of oxygen and bFGF on the vulnerability of photoreceptors to light damage“. In: *Investigative ophthalmology and visual science* 42, S. 804–15.
- Brazil, D. P. & B. A. Hemmings (Nov. 2001). „Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow.“ eng. In: *Trends in biochemical sciences* 26 (11), S. 657–64.
- Bucher, Felicitas et al. (Aug. 2016). „CNTF Attenuates Vasoproliferative Changes Through Upregulation of SOCS3 in a Mouse-Model of Oxygen-Induced Retinopathy.“ eng. In: *Investigative ophthalmology and visual science* 57 (10), S. 4017–26.
- Buhl, R. et al. (März 2021). „S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma“. ger. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 75 (3), S. 191–200.
- Cai, Xiao-Fang, Ji-Min Sun & Wen-Bin Li (Sep. 2014). „[Effect of hyperoxia on p53 and PCNA expression in fetal rat lung fibroblasts].“ chi. In: *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics* 16 (9), S. 922–6.

- Cattaneo, Elena, Luciano Conti & Claudio De-Fraja (1999). „Signalling through the JAK–STAT pathway in the developing brain“. In: *Trends in Neurosciences* 22.8, S. 365–369. ISSN: 0166-2236.
- Chang, Eddie et al. (Juli 2007). „Effect of hyperoxia on cortical neuronal nuclear function and programmed cell death mechanisms.“ eng. In: *Neurochemical research* 32 (7), S. 1142–9.
- Chi, P., P. Greengard & T. A. Ryan (Dez. 2001). „Synapsin dispersion and reclusterung during synaptic activity.“ eng. In: *Nature neuroscience* 4 (12), S. 1187–93.
- Chung, In Y. et al. (Sep. 2010). „Protective effects of triamcinolone acetonide upon the upregulation and phosphorylation of GAP 43 in an animal model of retinopathy of prematurity.“ eng. In: *Acta ophthalmologica* 88 (6), e217–21.
- Civiero, Laura & Elisa Greggio (Feb. 2018). „PAKs in the brain: Function and dysfunction.“ eng. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1864 (2), S. 444–453.
- Clark, D. A. & R. Coker (März 1998). „Transforming growth factor-beta (TGF-beta).“ eng. In: *The international journal of biochemistry and cell biology* 30 (3), S. 293–8.
- Cory, Suzanne & Jerry M. Adams (Juli 2005). „Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch.“ eng. In: *Cancer cell* 8 (1), S. 5–6.
- Couillard-Despres, Sebastien et al. (Jan. 2005). „Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis.“ eng. In: *The European journal of neuroscience* 21 (1), S. 1–14.
- Croker, Ben A. et al. (Juni 2003). „SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo.“ eng. In: *Nature immunology* 4 (6), S. 540–5.
- D’Arcangelo, G. et al. (Apr. 2000). „Interleukin-6 inhibits neurotransmitter release and the spread of excitation in the rat cerebral cortex.“ eng. In: *The European journal of neuroscience* 12 (4), S. 1241–52.
- Dapaah-Siakwan, Fredrick et al. (Sep. 2019). „Caspase-1 Inhibition Attenuates Hyperoxia-induced Lung and Brain Injury in Neonatal Mice.“ eng. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 61 (3), S. 341–354.
- Davidson, Lauren M. & Sara K. Berkelhamer (Jan. 2017). „Bronchopulmonary Dysplasia: Chronic Lung Disease of Infancy and Long-Term Pulmonary Outcomes.“ eng. In: *Journal of clinical medicine* 6 (1).
- Davis, J. B. & P. Maher (Juli 1994). „Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line.“ eng. In: *Brain research* 652 (1), S. 169–73.
- De Bels, David et al. (Feb. 2020). „Hyperoxia Alters Ultrastructure and Induces Apoptosis in Leukemia Cell Lines.“ eng. In: *Biomolecules* 10 (2).
- Dekeyser, Sven et al. (Apr. 2017). „„Unforgettable“ - a pictorial essay on anatomy and pathology of the hippocampus.“ eng. In: *Insights into imaging* 8 (2), S. 199–212.
- Deshmane, Satish L. et al. (Juni 2009). „Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview.“ eng. In: *Journal of interferon and cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29 (6), S. 313–26.
- Dieperink, Heather I., Timothy S. Blackwell & Lawrence S. Prince (Feb. 2006). „Hyperoxia and apoptosis in developing mouse lung mesenchyme.“ eng. In: *Pediatric research* 59 (2), S. 185–90.
- Dinarello, Charles A. (1988). „Interleukin-1“. In: *Digestive Diseases and Sciences* 33.3, 25S–35S. ISSN: 1573-2568.
- Diniz, Luan Pereira et al. (Juli 2019). „Astrocytes and the TGF- $\beta$ 1 Pathway in the Healthy and Diseased Brain: a Double-Edged Sword.“ eng. In: *Molecular neurobiology* 56 (7), S. 4653–4679.

- Dmitrieff, Elizabeth F. et al. (Feb. 2011). „Chronic hyperoxia alters the expression of neurotrophic factors in the carotid body of neonatal rats.“ eng. In: *Respiratory physiology and neurobiology* 175 (2), S. 220–7.
- Dzietko, M., V. Boos et al. (Dez. 2008). „A critical role for Fas/CD-95 dependent signaling pathways in the pathogenesis of hyperoxia-induced brain injury.“ eng. In: *Annals of neurology* 64 (6), S. 664–73.
- Dzietko, M., P. Deindl et al. (Juni 2016). „Erstversorgung und Reanimation des Neugeborenen.“ In: *Kinder- und Jugendmedizin*, S. 433–438.
- Engin, Atilla (2017). „Diet-Induced Obesity and the Mechanism of Leptin Resistance.“ eng. In: *Advances in experimental medicine and biology* 960, S. 381–397.
- Epstein Shochet, Gali et al. (Feb. 2020). „TGF- $\beta$  pathway activation by idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) fibroblast derived soluble factors is mediated by IL-6 trans-signaling.“ eng. In: *Respiratory research* 21 (1), S. 56.
- Fayard, Elisabeth et al. (Dez. 2005). „Protein kinase B/Akt at a glance.“ eng. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 24), S. 5675–8.
- Felderhoff-Mueser, Ursula, Petra Bittigau et al. (Nov. 2004). „Oxygen causes cell death in the developing brain.“ eng. In: *Neurobiology of disease* 17 (2), S. 273–82.
- Felderhoff-Mueser, Ursula, Oliver I. Schmidt et al. (Sep. 2005). „IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration?“ eng. In: *Trends in neurosciences* 28 (9), S. 487–93.
- Felderhoff-Mueser, Ursula, Marco Sifringer et al. (Jan. 2005). „Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain.“ eng. In: *Annals of neurology* 57 (1), S. 50–9.
- Gadad, Bharathi S. et al. (Juni 2021). „Altered levels of interleukins and neurotrophic growth factors in mood disorders and suicidality: an analysis from periphery to central nervous system.“ eng. In: *Translational psychiatry* 11 (1), S. 341.
- Galam, Lakshmi et al. (Juli 2015). „Adenovirus-mediated transfer of the SOCS-1 gene to mouse lung confers protection against hyperoxic acute lung injury.“ eng. In: *Free radical biology and medicine* 84, S. 196–205.
- Garlanda, Cecilia, Charles A. Dinarello & Alberto Mantovani (Dez. 2013). „The interleukin-1 family: back to the future.“ eng. In: *Immunity* 39 (6), S. 1003–18.
- Gartel, Andrei L. & Senthil K. Radhakrishnan (Mai 2005). „Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences.“ eng. In: *Cancer research* 65 (10), S. 3980–5.
- Gehen, Sean C. et al. (März 2007). „Downregulation of PCNA potentiates p21-mediated growth inhibition in response to hyperoxia.“ eng. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 292 (3), S. L716–24.
- Gerstner, Bettina et al. (Aug. 2006). „Maturation-dependent oligodendrocyte apoptosis caused by hyperoxia.“ eng. In: *Journal of neuroscience research* 84 (2), S. 306–15.
- Greco, Allison A. & George Gomez (Feb. 2014). „Differential effects of hypoxic and hyperoxic stress-induced hypertrophy in cultured chick fetal cardiac myocytes.“ eng. In: *In vitro cellular and developmental biology. Animal* 50 (2), S. 129–38.
- Grewal, S. S., R. D. York & P. J. Stork (Okt. 1999). „Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons.“ eng. In: *Current opinion in neurobiology* 9 (5), S. 544–53.
- Gyongyosi, Alexandra et al. (2018). „The Impact of Moderate Chronic Hypoxia and Hyperoxia on the Level of Apoptotic and Autophagic Proteins in Myocardial Tissue.“ eng. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018, S. 5786742.

- Hakkoum, David, Luc Stoppini & Dominique Muller (Feb. 2007). „Interleukin-6 promotes sprouting and functional recovery in lesioned organotypic hippocampal slice cultures.“ eng. In: *Journal of neurochemistry* 100 (3), S. 747–57.
- Heinrich, P. C. et al. (Sep. 1998). „Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway.“ eng. In: *The Biochemical journal* 334 ( Pt 2) (Pt 2), S. 297–314.
- Heinzl, Susanne (Dez. 2008). „Tocilizumab in rheumatoid arthritis. Interleukin 6 as a new target“. ger. In: *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* 31 (12), S. 450–3.
- Helt, Christopher E. et al. (März 2004). „The Cdk and PCNA domains on p21Cip1 both function to inhibit G1/S progression during hyperoxia.“ eng. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 286 (3), S. L506–13.
- Herrera, Federico, Qi Chen & David Schubert (Dez. 2010). „Synergistic effect of retinoic acid and cytokines on the regulation of glial fibrillary acidic protein expression.“ eng. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (50), S. 38915–22.
- Hintz, Susan R. et al. (Juni 2005). „Changes in neurodevelopmental outcomes at 18 to 22 months' corrected age among infants of less than 25 weeks' gestational age born in 1993-1999.“ eng. In: *Pediatrics* 115 (6), S. 1645–51.
- Hirani, Dharmesh et al. (Feb. 2022). „Macrophage-derived IL-6 trans-signalling as a novel target in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia.“ eng. In: *The European respiratory journal* 59 (2).
- Hokuto, Isamu et al. (Jan. 2004). „Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia.“ eng. In: *The Journal of clinical investigation* 113 (1), S. 28–37.
- Horesh, D. et al. (Sep. 1999). „Doublecortin, a stabilizer of microtubules.“ eng. In: *Human molecular genetics* 8 (9), S. 1599–610.
- Husari, Ahmad W. et al. (Juli 2006). „Apoptosis and the activity of ceramide, Bax and Bcl-2 in the lungs of neonatal rats exposed to limited and prolonged hyperoxia.“ eng. In: *Respiratory research* 7 (1), S. 100.
- Hyman, C. et al. (März 1991). „BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra.“ eng. In: *Nature* 350 (6315), S. 230–2.
- Ito, D. et al. (Juni 1998). „Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1.“ eng. In: *Brain research. Molecular brain research* 57 (1), S. 1–9.
- Jegalian, Armin G. & Hong Wu (Jan. 2002). „Regulation of Socs gene expression by the proto-oncoprotein GFI-1B: two routes for STAT5 target gene induction by erythropoietin.“ eng. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (3), S. 2345–52.
- Kang, Seok K., Nicole A. Hawkins & Jennifer A. Kearney (März 2019). „C57BL/6J and C57BL/6N substrains differentially influence phenotype severity in the Scn1a (+/-) mouse model of Dravet syndrome.“ eng. In: *Epilepsia open* 4 (1), S. 164–169.
- Kim, Do-Hyun et al. (Juni 2010). „Association of increased pulmonary interleukin-6 with the priming effect of intra-amniotic lipopolysaccharide on hyperoxic lung injury in a rat model of bronchopulmonary dysplasia.“ eng. In: *Neonatology* 98 (1), S. 23–32.
- Klein, Robyn et al. (Okt. 2021). *COVID-19 induces neuroinflammation and loss of hippocampal neurogenesis.* eng.
- Kovács, K. J. (Okt. 1998). „c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map.“ eng. In: *Neurochemistry international* 33 (4), S. 287–97.

- Kurki, P. et al. (Sep. 1986). „Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle.“ eng. In: *Experimental cell research* 166 (1), S. 209–19.
- Levy, David E. & Chien-kuo Lee (Mai 2002). „What does Stat3 do?“ eng. In: *The Journal of clinical investigation* 109 (9), S. 1143–8.
- Lewis, Geoffrey P. et al. (Juni 2004). „The efficacy of delayed oxygen therapy in the treatment of experimental retinal detachment.“ eng. In: *American journal of ophthalmology* 137 (6), S. 1085–95.
- Lin, L. F. et al. (Mai 1993). „GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons.“ eng. In: *Science (New York, N.Y.)* 260 (5111), S. 1130–2.
- Lisman, John, György Buzsáki et al. (Okt. 2017). „Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition.“ eng. In: *Nature neuroscience* 20 (11), S. 1434–1447.
- Lisman, John, Ryohei Yasuda & Sridhar Raghavachari (Feb. 2012). „Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation.“ eng. In: *Nature reviews. Neuroscience* 13 (3), S. 169–82.
- Loppnow, H. (Jan. 2001). „[Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action].“ ger. In: *Der Internist* 42 (1), S. 13–4, 17–27.
- Lu, Ming et al. (Okt. 2019). „CTGF Triggers Rat Astrocyte Activation and Astrocyte-Mediated Inflammatory Response in Culture Conditions.“ eng. In: *Inflammation* 42 (5), S. 1693–1704.
- Mackay, F. et al. (Mai 1993). „Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55.“ eng. In: *The Journal of experimental medicine* 177 (5), S. 1277–86.
- Mattson, M. P. et al. (Feb. 1997). „Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer’s disease.“ eng. In: *Brain research. Brain research reviews* 23 (1-2), S. 47–61.
- Middeldorp, J. & E. M. Hol (März 2011). „GFAP in health and disease.“ eng. In: *Progress in neurobiology* 93 (3), S. 421–43.
- Mohr, Jasmine et al. (Mai 2019). „IL-6/Smad2 signaling mediates acute kidney injury and regeneration in a murine model of neonatal hyperoxia.“ eng. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33 (5), S. 5887–5902.
- Möller, Jens Carsten et al. (Mai 2006). „Release of interleukin-6 via the regulated secretory pathway in PC12 cells.“ eng. In: *Neuroscience letters* 400 (1-2), S. 75–9.
- Monis, Paul T., Steven Giglio & Christopher P. Saint (Mai 2005). „Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis.“ eng. In: *Analytical biochemistry* 340 (1), S. 24–34.
- Mülhardt, Cornel (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie Genomics*. 6. Aufl. Experimentator. Heidelberg: Springer. ISBN: 9783827421586.
- Munshi, L. & N.D. Ferguson (Feb. 2020). „Evolving Issues in Oxygen Therapy in Acute Care Medicine.“ eng. In: *JAMA* 323 (7), S. 607–608.
- Nagase, Haruna et al. (Jan. 2020). „Reduced Sulfation Enhanced Oxytosis and Ferroptosis in Mouse Hippocampal HT22 Cells.“ eng. In: *Biomolecules* 10 (1).
- Neufeld, G. et al. (Jan. 1999). „Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.“ eng. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 (1), S. 9–22.
- Nishikai-Yan Shen, Tsubame et al. (2017). „Interleukin-6 stimulates Akt and p38 MAPK phosphorylation and fibroblast migration in non-diabetic but not diabetic mice.“ eng. In: *PloS one* 12 (5), e0178232.

- Northway, William H., Robert C. Rosan & David Y. Porter (1967). „Pulmonary Disease Following Respirator Therapy of Hyaline-Membrane Disease“. In: *New England Journal of Medicine* 276.7. PMID: 5334613, S. 357–368.
- Nyunoya, Toru et al. (Juli 2005). „Macrophages survive hyperoxia via prolonged ERK activation due to phosphatase down-regulation.“ eng. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (28), S. 26295–302.
- O'Brien, Brendan J. et al. (Apr. 2021). „CaMKII $\delta$  is upregulated by pro-inflammatory cytokine IL-6 in a JAK/STAT3-dependent manner to promote angiogenesis.“ eng. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (4), e21437.
- Okuma, Toshiyuki et al. (Dez. 2006). „MCP-1/CCR2 signalling pathway regulates hyperoxia-induced acute lung injury via nitric oxide production.“ eng. In: *International journal of experimental pathology* 87 (6), S. 475–83.
- Ozdemir, Ahmet et al. (Aug. 2019). „Can lycopene eliminate the harmful effects of hyperoxia in an immature brain?“ spa. In: *Archivos argentinos de pediatria* 117 (4), S. 237–244.
- Ozen, Ilknur et al. (Jan. 2020). „Interleukin-1 Beta Neutralization Attenuates Traumatic Brain Injury-Induced Microglia Activation and Neuronal Changes in the Globus Pallidus.“ eng. In: *International journal of molecular sciences* 21 (2).
- Perlman, Harris et al. (Jan. 2003). „IL-6 and matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in synovial fibroblasts.“ eng. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (2), S. 838–45.
- Perlman, Jeffrey M. et al. (Nov. 2010). „Neonatal resuscitation: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations.“ eng. In: *Pediatrics* 126 (5), e1319–44.
- Ramani, Manimaran et al. (Feb. 2013). „Neurodevelopmental impairment following neonatal hyperoxia in the mouse.“ eng. In: *Neurobiology of disease* 50, S. 69–75.
- Rattner, Amir, John Williams & Jeremy Nathans (Aug. 2019). „Roles of HIFs and VEGF in angiogenesis in the retina and brain.“ eng. In: *The Journal of clinical investigation* 129 (9), S. 3807–3820.
- Rauci, Franca et al. (Dez. 2006). „Proliferative activity in the frog brain: a PCNA-immunohistochemistry analysis.“ eng. In: *Journal of chemical neuroanatomy* 32 (2-4), S. 127–42.
- Reed, J. C. (Dez. 1998). „Bcl-2 family proteins.“ eng. In: *Oncogene* 17 (25), S. 3225–36.
- Rehm, Hubert (2010). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Hrsg. von Thomas Letzel. 6. Aufl. Experimentator. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 8 ff. ISBN: 9783827423139.
- Reich, Bettina et al. (2016). „Hyperoxia and the Immature Brain.“ eng. In: *Developmental neuroscience* 38 (5), S. 311–330.
- Scheller, Jürgen et al. (Mai 2011). „The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6.“ eng. In: *Biochimica et biophysica acta* 1813 (5), S. 878–88.
- Schmidt, Barbara et al. (März 2003). „Impact of bronchopulmonary dysplasia, brain injury, and severe retinopathy on the outcome of extremely low-birth-weight infants at 18 months: results from the trial of indomethacin prophylaxis in preterms.“ eng. In: *JAMA* 289 (9), S. 1124–9.
- Scoville, W. B. & B. Milner (Feb. 1957). „Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions.“ eng. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 20 (1), S. 11–21.
- Sendtner, M. et al. (Nov. 1994). „Ciliary neurotrophic factor.“ eng. In: *Journal of neurobiology* 25 (11), S. 1436–53.

- Sengoku, T., K. M. Murray & M. E. Wilson (Feb. 2016). „Neonatal hyperoxia induces alterations in neurotrophin gene expression.“ eng. In: *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 48, S. 31–7.
- Serdar, Meray et al. (2018). „Protection of Oligodendrocytes Through Neuronal Overexpression of the Small GTPase Ras in Hyperoxia-Induced Neonatal Brain Injury.“ eng. In: *Frontiers in neurology* 9, S. 175.
- Sheikh, Ashfaq M. et al. (Sep. 2010). „BDNF-Akt-Bcl2 antiapoptotic signaling pathway is compromised in the brain of autistic subjects.“ eng. In: *Journal of neuroscience research* 88 (12), S. 2641–7.
- Shenberger, Jeffrey S. et al. (Sep. 2007). „Hyperoxia enhances VEGF release from A549 cells via post-transcriptional processes.“ eng. In: *Free radical biology and medicine* 43 (5), S. 844–52.
- Sifringer, M., I. Bendix et al. (Jan. 2012). „Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis.“ eng. In: *Cell death & disease* 3 (1), e250.
- Sifringer, M., D. Brait et al. (Juli 2010). „Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain.“ eng. In: *Brain, behavior, and immunity* 24 (5), S. 792–9.
- Sobah, Mohamed Luban, Clifford Liongue & Alister C. Ward (2021). „SOCS Proteins in Immunity, Inflammatory Diseases, and Immune-Related Cancer.“ eng. In: *Frontiers in medicine* 8, S. 727987.
- Stahl, Andreas & Wolfgang Göpel (2015). „Screening und Behandlung der Frühgeborenenretinopathie.“ In: *Deutsches Ärzteblatt International* 112.43, S. 730–735.
- Stiles, Joan & Terry L. Jernigan (Dez. 2010). „The basics of brain development.“ eng. In: *Neuropsychology review* 20 (4), S. 327–48.
- Sturm, M. et al. (März 2015). „Effect of chronic corticosterone application on depression-like behavior in C57BL/6N and C57BL/6J mice.“ eng. In: *Genes, brain, and behavior* 14 (3), S. 292–300.
- Swiatek-Machado, Karolina & Bozena Kaminska (2020). „STAT Signaling in Glioma Cells.“ eng. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1202, S. 203–222.
- Tagliatela, G., J. R. Perez-Polo & D. K. Rassin (Nov. 1998). „Induction of apoptosis in the CNS during development by the combination of hyperoxia and inhibition of glutathione synthesis.“ eng. In: *Free radical biology and medicine* 25 (8), S. 936–42.
- Terraneo, Laura & Michele Samaja (Sep. 2017). „Comparative Response of Brain to Chronic Hypoxia and Hyperoxia.“ eng. In: *International journal of molecular sciences* 18 (9).
- Treves, A. & E. T. Rolls (Juni 1994). „Computational analysis of the role of the hippocampus in memory.“ eng. In: *Hippocampus* 4 (3), S. 374–91.
- Usami, Masayuki et al. (Nov. 2018). „Genetic differences in C57BL/6 mouse substrains affect kidney crystal deposition.“ eng. In: *Urolithiasis* 46 (6), S. 515–522.
- Vernerey, Julien et al. (Feb. 2013). „Ciliary neurotrophic factor controls progenitor migration during remyelination in the adult rodent brain.“ eng. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (7), S. 3240–50.
- Vogelmeier, C. et al. (Apr. 2018). „[Guideline for the Diagnosis and Treatment of COPD Patients - Issued by the German Respiratory Society and the German Atemwegsliga in Cooperation with the Austrian Society of Pneumology].“ ger. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 72 (4), S. 253–308.
- Wang, Xiaoyang et al. (Sep. 2010). „Neuroprotective effect of Bax-inhibiting peptide on neonatal brain injury.“ eng. In: *Stroke* 41 (9), S. 2050–5.

- Wang, Xinbao, Hong Cui & Shu Wu (Okt. 2019). „CTGF: A potential therapeutic target for Bronchopulmonary dysplasia.“ eng. In: *European journal of pharmacology* 860, S. 172588.
- Weichelt, Ulrike et al. (Apr. 2013). „Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine.“ eng. In: *The European respiratory journal* 41 (4), S. 966–73.
- Westhoff, M. et al. (Dez. 2015). „[Noninvasive Mechanical Ventilation in Acute Respiratory Failure].“ ger. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 69 (12), S. 719–756.
- Yokoyama, Toshifumi et al. (Apr. 2019). „Genetic differences between C57BL/6 substrains affect the process of testis differentiation in Y(POS) mice.“ eng. In: *The Journal of veterinary medical science* 81 (4), S. 608–611.
- You, Kai et al. (Nov. 2019). „Moderate hyperoxia induces senescence in developing human lung fibroblasts.“ eng. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 317 (5), S. L525–L536.
- Yun, M. R. et al. (Jan. 2018). „ERK-dependent IL-6 autocrine signaling mediates adaptive resistance to pan-PI3K inhibitor BKM120 in head and neck squamous cell carcinoma.“ eng. In: *Oncogene* 37 (3), S. 377–388.
- Zara, Susi et al. (Nov. 2013). „NF- $\kappa$ B involvement in hyperoxia-induced myocardial damage in newborn rat hearts.“ eng. In: *Histochemistry and cell biology* 140 (5), S. 575–83.
- Zhang, Kai et al. (Juli 2018). „Role of MCP-1 and CCR2 in ethanol-induced neuroinflammation and neurodegeneration in the developing brain.“ eng. In: *Journal of neuroinflammation* 15 (1), S. 197.
- Zhang, Ting et al. (2019). „Inhibition of TGF- $\beta$ -Smad signaling attenuates hyperoxia-induced brain damage in newborn rats.“ eng. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 12 (10), S. 3772–3781.
- Zurn, A. D. et al. (Apr. 1996). „Combined effects of GDNF, BDNF, and CNTF on motoneuron differentiation in vitro.“ eng. In: *Journal of neuroscience research* 44 (2), S. 133–41.

## 7 Anhang

### Abbildungsverzeichnis

1	Bronchopulmonale Dysplasie . . . . .	13
2	Auswirkung der Hyperoxie auf das Gehirn . . . . .	14
3	Hippocampus. Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Neuroscience, Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition; John Lisman et al., 2017. COPYRIGHT. Advance online publication, Oktober 2017 (doi: 10.1038/nn.4661) Springer Nature, Nature Neuroscience. <a href="https://www.nature.com/articles/nn.4661">https://www.nature.com/articles/nn.4661</a> . . . . .	15
4	HT22 Neuronen . . . . .	16
5	Funktionen Interleukin 6 . . . . .	18
6	Syntheseweg IL6, SOCS3 und STAT3 . . . . .	21
7	Synthese IL6, GFAP . . . . .	22
8	Übersicht Gen-/ Proteinexpression der bisher durchgeführten Versuche . . . . .	27
9	Aufbau des Tierversuchs . . . . .	30
10	Aufbau des Zellkulturversuchs . . . . .	31
11	Aufbau Blotting . . . . .	47
12	Funktionsweise Antikörper . . . . .	47
13	Relative mRNA-Expression von Gen IL6 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. *** $p \leq 0,001$ , **** $p \leq 0,0001$ . . . . .	54
14	Relative mRNA-Expression von Gen IL6 (neuer Primer) im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. **** $p \leq 0,0001$ . . . . .	55
15	Relative Protein-Expression von Protein SOCS3 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. . . . .	56
16	Relative Protein-Expression von Protein pSTAT3/STAT3 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. * $p \leq 0,05$ . . . . .	57
17	Relative mRNA-Expression von Gen IL1 beta im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. . . . .	58
18	Relative mRNA-Expression von Gen TNF alpha im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. . . . .	58

19	Relative mRNA-Expression von Gen MCP1 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. * $p \leq 0,05$ , ** $p \leq 0,01$ , *** $p \leq 0,001$ . . . . .	59
20	Relative Protein-Expression von Protein Iba1 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28 . . . . .	60
21	Relative mRNA-Expression von Gen TGF beta im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. ** $p \leq 0,01$ , *** $p \leq 0,001$ . . . . .	61
22	Relative mRNA-Expression von Gen CTGF im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. ** $p \leq 0,01$ , *** $p \leq 0,001$ , **** $p \leq 0,0001$ . . . . .	61
23	Relative Protein-Expression von Protein GFAP im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. *** $p \leq 0,001$ . . . . .	62
24	Relative mRNA-Expression von Gen BDNF im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. *** $p \leq 0,001$ . . . . .	63
25	Relative mRNA-Expression von Gen GDNF im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. ** $p \leq 0,01$ . . . . .	64
26	Relative mRNA-Expression von Gen CNTF im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28 . . . . .	64
27	Relative mRNA-Expression von Gen VEGF im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. ** $p \leq 0,01$ , **** $p \leq 0,0001$ . . . . .	65
28	Relative mRNA-Expression von Gen PCNA im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. * $p \leq 0,05$ , *** $p \leq 0,001$ . . . . .	66

29	Relative mRNA-Expression von Gen p21 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 . . . . .	66
30	Relative Protein-Expression von Protein Doublecortin im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. ** p ≤ 0,01 . . . . .	67
31	Relative Protein-Expression von Protein pErk/Erk im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01 . . . . .	68
32	Relative Protein-Expression von Protein pErk/Erk in HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rot mit schwarzen Schraffierungen) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (blau mit schwarzen Schraffierungen) 24h, 48h und 72h. . . . .	69
33	Relative Protein-Expression von Protein pAkt/Akt im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. * p ≤ 0,05 . . . . .	70
34	Relative Protein-Expression von Protein pErk/Erk in HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rot mit schwarzen Schraffierungen) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (blau mit schwarzen Schraffierungen) 24h, 48h und 72h. . . . .	71
35	MTT-Assay von HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rosa) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (hellblau) 24h, 48h und 72h. . . . .	72
36	Relative mRNA-Expression von Gen BAX im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. . . . .	73
37	Relative mRNA-Expression von Gen BCL2 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. . . . .	73
38	Caspase-Assay von HT22-Zellen unter Normoxie (grüner Kreis), HT22-Zellen unter Hyperoxie (dunkelblaues Dreieck), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (grünes Quadrat) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (hellblaues Dreieck) 24h, 48h und 72h. . . . .	74
39	Relative mRNA-Expression von Gen cfos im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. . . . .	75

40	Relative Protein-Expression von Protein pCAMKII/CAMKII im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. * $p \leq 0,05$ , ** $p \leq 0,01$ . . . . .	76
41	Relative Protein-Expression von Protein pSynapsin/Synapsin im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. * $p \leq 0,05$ . . . . .	77
42	Relative Protein-Expression von Protein GAP43 im Hippocampus von WT-Tieren unter Normoxie (schwarz schraffiert), WT-Tieren unter Hyperoxie (schwarz), KO-Tieren unter Normoxie (blau schraffiert) und KO-Tieren unter Hyperoxie (blau) P28. * $p \leq 0,05$ . . . . .	78
43	Relative mRNA-Expression von Gen cFos in HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rosa) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (hellblau) 24h, 48h und 72h. . . . .	79
44	Synapsin Immunofluoreszenz von HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rosa) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (hellblau) 24h, 48h und 72h. * $p \leq 0,05$ , ** $p \leq 0,01$ , *** $p \leq 0,001$ , **** $p \leq 0,0001$ . . . . .	80
45	Neurite outgrowth von HT22-Zellen unter Normoxie (rot), HT22-Zellen unter Hyperoxie (blau), HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Normoxie (rosa) und HT22-Zellen mit IL6-Blockade unter Hyperoxie (hellblau) 24h, 48h und 72h. * $p \leq 0,05$ , ** $p \leq 0,01$ , *** $p \leq 0,001$ , **** $p \leq 0,0001$ . . . . .	81

## Tabellenverzeichnis

1	Zellkonzentrationen . . . . .	32
2	Hard- und Software . . . . .	33
3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	34
4	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	35
5	Zellkultur . . . . .	36
6	Histologie . . . . .	37
7	Puffer und Stammlösungen . . . . .	38
8	Chemikalien . . . . .	39
9	Oligonukleotide . . . . .	40
10	Antikörperliste . . . . .	42
11	Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Inflammation, IL-6-Zytokinwirkung und Gliose	83
12	Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Wachstumssignalwege . . . . .	87
13	Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Apoptose . . . . .	91
14	Auswirkung der Hyperoxie und IL-6-Blockade auf Plastizität . . . . .	93