

**Untersuchungen zur Wirkung von oxidativem Stress
auf die pulmonale Inflammation und Fibrose im
Mausmodell der Ataxia-Teleangiectasia**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Ruth Pia Dücker
geb. am 17. November 1983 in Marl

D77
Mainz, 2018

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2018

Inhalt

Eidesstattliche Erklärung	I
Abkürzungen.....	II
Zusammenfassung	V
Summary	VI
1. Einleitung	10
1.1 Ataxia-Teleangiectasia – Das Krankheitsbild.....	10
1.2 Die Lungenerkrankung bei A-T	12
1.2.1 Der Aufbau der Lunge.....	12
1.2.2 Die Lungenerkrankung bei A-T	14
1.3 ATM und oxidativer Stress	16
1.4 Die pulmonalen Reaktionen auf oxidativen Stress	12
1.5 Die Lungenschädigung im <i>Atm</i> -Knock out Mausmodell.....	10
1.6 Ziele der Arbeit	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Verwendete Materialien	15
2.1.1 Die <i>Atm</i> -defiziente Maus.....	15
2.1.2 Zelllinien	15
2.1.3 Geräte	15
2.1.4 Verbrauchsmaterial und Glas	17
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.1.6 Antikörper	20
2.1.7 Kits	20
2.1.8 Software.....	20
2.1.9 Puffer und Lösungen	21
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Isolierung von murinen Lungenzellen.....	23
2.2.2 Kultivierung und Erhaltung der humanen Lungentumorzelllinie A-549	24

2.2.3	Ermittlung der Lebendzellzahl	24
2.2.4	Proliferationsassay.....	25
2.2.5	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in A-549 Zellen und murinen Lungenzellen.....	25
2.2.6	Messung von DNA Schädigungen mittels γ H2AX Assay	25
2.2.7	Comet Assay.....	26
2.2.8	Studiendesign der <i>in vivo</i> Versuche	28
2.2.9	Induktion der Lungenerkrankung/Lungenfibrose durch oropharyngeale Verabreichung von BLM	30
2.2.10	Invasive Lungenfunktionsmessung mit dem flexiVent-System.....	31
2.2.11	Bronchoalveoläre Lavage.....	32
2.2.12	Anfertigung von Zytospins und Giemsa-Färbung der BAL-Zellen	32
2.2.13	Histologie – Perfusion der Lunge.....	33
2.2.14	Paraffineinbettung	33
2.2.15	Paraffinschnitte.....	34
2.2.16	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	34
2.2.17	Masson-Trichrom-Färbung	35
2.2.18	Quantifizierung der Lungenschnitte mittels Ashcroft Score	35
2.2.18	Cytometric Bead Array	36
2.2.19	Durchflusszytometrie	36
2.2.20	Statistische Analysen.....	36
3.	Ergebnisse	38
3.1	Differenzielle Leukozytentypisierung in der BAL	38
3.2	Charakterisierung primärer Lungenzellen von unbehandelten <i>Atm</i> -defizienten und Wildtyp-Mäusen	39
3.3	Oxidativer Stress in alveolären Typ-2 Zellen von <i>Atm</i> -defizienten Mäusen	40
3.4	Einfluss von Bleomycin auf die Vitalität <i>Atm</i> -defizienter Mäuse	41

3.5 BLM-induzierte pulmonale Inflammation in Lungen <i>Atm</i> -defizienter Mäuse nach BLM-Gabe	43
3.6 Manifestation fibrosierender Lungenerkrankungen in Bleomycin behandelten <i>Atm</i> -defizienten Mäusen	46
3.7 Effekt von BLM auf die Lungenfunktionsmessung in <i>Atm</i> -defizienten Mäusen ...	48
3.8 Effekt von BLM auf die Zellviabilität <i>in vitro</i>	51
3.9 Effekt von BLM auf intrazelluläre ROS <i>in vitro</i>	53
3.10 Effekt von BLM auf DNA-Schädigungen <i>in vitro</i>	55
4. Diskussion.....	59
5. Ausblick	68
6. Literaturverzeichnis	69
7. Anhang.....	88
7.1 Abbildungsverzeichnis	88
7.2 Publikationen und Tagungsbeiträge	90
7.3 Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
7.4 Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken (dazu zählen auch Internetquellen) entnommen sind, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Mainz, den

Ruth Pia Dücker

Abkürzungen

8-OH-dG	8-hydroxy-desoxyguanosin
AEC1	<i>Alveolar epithelial type-1 cells</i>
AEC2	<i>Alveolar epithelial type-2 cells</i>
ALI	<i>Acute lung injury</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
A-T	Ataxia-Teleangiectasia
ATM	Ataxia Teleangiectasia-mutated
<i>Atm^{-/-}</i>	<i>Atm-Knockout</i>
<i>Atm^{+/+}</i>	<i>Atm-Wildtyp</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related protein</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	<i>Bronchoalveolar Lavage Fluid</i>
BASC	Bronchioalveoläre Stammzelle
BLM	Bleomycin
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
Chk2	<i>Checkpoint-Kinase 2</i>
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
Crs	<i>Compliance</i>
CT	Computertomographie
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DCF	2'-7'dichlorofluorescein
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DSB	<i>Double Strand Break</i> , Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ers	<i>Elastanz</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fötales Kälberserum
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht
G	Gauge
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
IgA	Immunglobulin A
IgG ₂	Immunglobulin G ₂
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IPF	idiopathische Lungenfibrose
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KMZ	Knochenmarkszellen
KO	Knockout
Luc	Luciferase
mASC	<i>Murine adipose stromal cells</i>

MSC	Mesenchymale Stammzelle
MFI	<i>Mean Fluorescent Intensity</i>
Mre11	<i>Meiotic recombination 11</i>
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
PBS	<i>Phosphate Bufffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PFA	Paraformaldehyd
PI(3)KK	Phosphatidylinositol-3-Kinase ähnliche Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
Rrs	Resistenz
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard Error of Measurement</i>
SOD	Superoxiddismutase
S-Phase	Synthese Phase
SSC	Seitwärtsstreulicht
SSB	<i>Single Strand Break</i> , Einzelstrangbruch
TNF	Tumornekrosefaktor
UV-	Ultraviolett
WT	Wildtyp
γ H2AX	(phosphoryliertes) Histon 2AX

Zusammenfassung

Die chronische Lungenerkrankung ist für die Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Ataxia-Teleangiectasia (A-T) hauptverantwortlich. Störungen in der Redoxbalance von Alveolarepithelzellen müssen als ein kausaler Faktor für Atemwegserkrankungen bei dieser Erkrankung betrachtet werden. Um die bronchoalveoläre Empfindlichkeit gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und ROS-induzierten DNA-Schäden zu untersuchen, wurde Bleomycin (BLM) verwendet, um eine experimentelle pulmonale Entzündungen und fibrotische Veränderungen im *Atm*-defizienten Mausmodell zu induzieren.

BLM oder isotone Kochsalzlösung wurde durch oropharyngeale Instillation in die Lunge von *Atm*-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen verabreicht. Die Mäuse wurden an den Tagen 0, 9 und 28 einer Lungenfunktionsprüfung unterzogen und die bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde auf die Zellverteilung und Sekretion von Zytokinen hin untersucht. Das Lungengewebe wurde histochemisch auf Neutrophileninfiltration und Kollagen deposition analysiert.

Die Applikation von BLM führte zu einem enormen Anstieg der pulmonalen Inflammation und fibrotischen Veränderungen im Lungengewebe von *Atm*-defizienten Mäusen und war von einer irreversiblen Verschlechterung der Lungenfunktion begleitet. Die ATM- (Ataxia telangiectasia mutiert) Defizienz führte zu einer verminderten Viabilität der Zellen, einer verzögerten Resolution der γ H2AX-Expression und einem signifikanten Anstieg der intrazellulären ROS in Lungenepithelzellen nach der Behandlung mit BLM. Dies wurde in der humanen Epithelzelllinie A-549 bestätigt, die mit dem ATM-Kinase Inhibitor KU55933 behandelt wurde.

Unsere Ergebnisse zeigen eine hohe bronchoalveoläre Sensitivität gegenüber ROS und ROS-induzierten DNA-Schäden im *Atm*-defizienten Mausmodell und unterstützen die Hypothese, dass ATM eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von oxidativem Stress bedingten Lungenentzündungen und Fibrosen spielt.

Summary

Lung failure is responsible for significant morbidity and is a frequent cause of death in ataxia-telangiectasia (A-T). Disturbance in the redox balance of alveolar epithelial cells must be considered as a causal factor for respiratory disease in A-T. To investigate bronchoalveolar sensitivity to reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced DNA damage, we used bleomycin (BLM) to induce experimental inflammation and fibrotic changes in the *Atm*-deficient mouse model.

BLM or saline was administered by oropharyngeal instillation into the lung of *Atm*-deficient mice and wild-type mice. Mice underwent pulmonary function testing at days 0, 9, and 28, and bronchoalveolar lavage (BAL) was analyzed for cell distribution and cytokines. Lung tissue was analyzed by histochemistry.

BLM administration resulted in a tremendous increase in lung inflammation and fibrotic changes in the lung tissue of *Atm*-deficient mice and was accompanied by irreversible deterioration of lung function. ATM (ataxia telangiectasia mutated) deficiency resulted in reduced cell viability, a delay in the resolution of γ H2AX expression and a significant increase in intracellular ROS in pulmonary epithelial cells after BLM treatment. This was confirmed in the human epithelial cell line A549 treated with the ATM-kinase inhibitor KU55933.

Our results demonstrate high bronchoalveolar sensitivity to ROS and ROS-induced DNA damage in the *Atm*-deficient mouse model and support the hypothesis that ATM plays a pivotal role in the control of oxidative stress-driven lung inflammation and fibrosis.

1. Einleitung

1.1 Ataxia-Teleangiectasia – Das Krankheitsbild

Die Ataxia-Teleangiectasia (A-T) ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die, wie das Bloom-Syndrom, das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) und die Faconi-Anämie, zur Gruppe der chromosomalen Instabilitätssyndrome gehört. Hervorgerufen wird die Erkrankung durch eine Mutation im ATM-Gen (Ataxia Telangiectasia Mutated), welches für ein ~370 kDa großes Protein, zugehörig zur Superfamilie der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI-3), kodiert (Savitsky et al. 1995). Die weltweite Inzidenz dieser Erkrankung liegt bei 1:100.000 (Orphanet. Ataxia-teleangiectasia www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=DE&Expert=100, letzte Aktualisierung Oktober 2007). In Deutschland geht man von einer Rate von 1:400.000 aus.

Die Erkrankung A-T wurde als erstes 1926 von Syllaba und Henner beschrieben und 30 Jahre später von Boder und Sedgwick als Erkrankung etabliert (Syllaba und Henner 1926; Boder und Sedgwick 1958; Henner 1968).

Patienten mit A-T leiden unter einem mannigfaltigen klinischen Erscheinungsbild. Die Erkrankung ist geprägt von einer progressiven zerebellären Ataxie, Teleangiektasien, Strahlungssensitivität, oxidativem Stress, erhöhtem Krebsrisiko, Immundefizienz, rezidivierenden pulmonalen Infektionen und einer hohen Rate an Lungenversagen (Abbildung 1) (Gatti et al. 2001; Boder und Sedgwick 1958). Lungenversagen sowie Leukämien und Lymphome sind die Hauptursachen für Morbidität und Mortalität (Micol et al. 2011; Khanna 2000). Derzeit sind nur symptomatische Therapien verfügbar. Es gibt keine Heilung für A-T (Lavin et al. 2007).

Der Neurodegeneration liegt ein Verlust der Purkinje-Zellen des Kleinhirns zugrunde. Dieser Verlust führt im Laufe der Erkrankung zu ataktischen Symptomen und fesselt die Patienten ab dem zweiten Lebensjahrzehnt an den Rollstuhl (Paula-Barbosa et al. 1983). Die Patienten fallen durch eine Gangunsicherheit auf, auch als „Clowns-Gang“ bezeichnet, wenn sie laufen lernen. Der unsichere Gang spiegelt hierbei die zerebelläre Degeneration (Ataxie) wider und ist ein Vorbote für die progressiven Schädigungen der Motoneuronen. Namensgebend treten erweiterte Blutgefäße (Teleangiektasien) im Bereich der Konjunktiva auf.

Immunologisch werden die Patienten durch rezidivierende Infektionen der Atemwege auffällig. Ein Immundefekt findet sich sowohl auf humoraler, als auch auf zellulärer Ebene. Störungen der humoralen Immunität sind durch einen kompletten IgA- und einen IgG₂ Subklassen-Mangel bei 60-80 % sowie einen IgE-Mangel bei 80 % der Patienten gekennzeichnet (McFarlin et al. 1972; Oxelius et al. 1982). Zudem ist die Immunantwort auf bakterielle Antigene gestört und die Antikörperproduktion auf Stimulation mit viralen Antigenen und Polysacchariden reduziert (Sanal et al. 1999; Schubert et al. 2002).

Kennzeichnend für Störungen der zellvermittelten Immunität sind das Fehlen oder die Degeneration des Thymus (Sedgwick und Boder 1960). Bei der Mehrzahl der Patienten liegt eine Lymphopenie mit Reduktion der naiven CD4 und CD8 T-Zellen sowie eine geringere Anzahl der B-Zellen vor (Schubert et al. 2002).

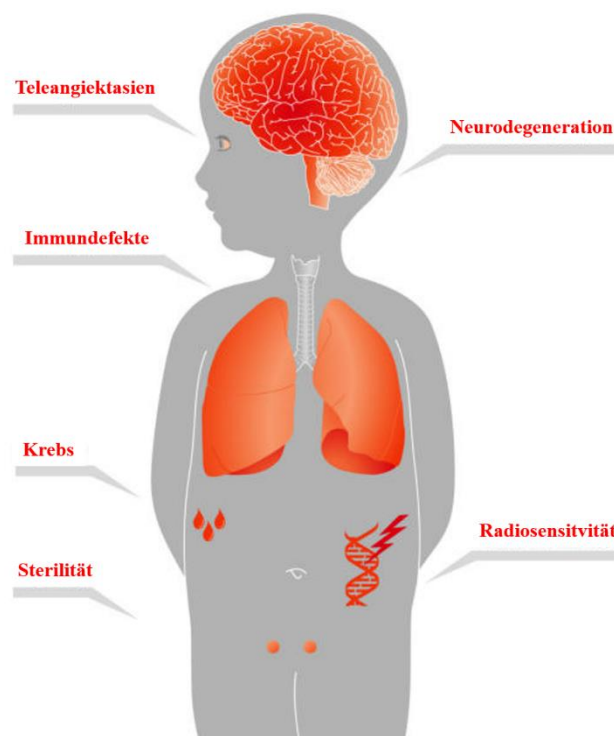


Abbildung 1. Ataxia-Teleangiectasia.

A-T ist eine Multisystemerkrankung, die aus der Mutation von ATM resultiert. Das Kennzeichen der klinischen Symptomatik ist eine progressive Neurodegeneration, extreme Strahlenempfindlichkeit, Immunschwäche, eine Prädisposition für Krebserkrankungen (hämatopoetische Malignome) und Sterilität aufgrund defekter meiotischer Rekombination (modifiziert nach McKinnon 2004: ATM and ataxia telangiectasia. EMBO Rep.).

Eine frühe Diagnose ist oft schwierig. Hier liefern die Ataxie und gehäufte Infektionen erste Verdachtsmomente auf die Erkrankung. Die Erhöhung des α -Fetoproteins im Serum (> 30 ng/ml) jenseits des 1. Lebensjahrs ist ein hilfreiches Mittel bei der Diagnosestellung

(Waldmann und McIntire 1972). Immunologisch ist die Bestimmung der Lymphozyten-Subpopulationen, der Immunglobuline, der IgG-Subklassen und der spezifischen Antikörper auf Polysaccharide und Proteine sinnvoll (Zielen 1995). Die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen in der G₂-Phase und letztendlich die genomische Mutationsanalyse sind weitere Methoden, um die Diagnose A-T zu verifizieren (Seyschab et al. 1992; Sandoval et al. 1999).

1.2 Die Lungenerkrankung bei A-T

1.2.1 Der Aufbau der Lunge

Die Lunge besitzt eine komplizierte Gewebestruktur und ist stark kompartimentiert. Der obere Teil ist der leitende Teil der Atemwege und besteht aus der Luftröhre, den beiden Hauptbronchien und den Bronchiolen. Der zweite Teil, bestehend aus Alveolen, ist die Gasaustauschfläche. In den oberen Atemwegen besteht das Epithel hauptsächlich aus Becherzellen, Basalzellen und submukosalem Drüsenepithel. In den unteren Atemwegen, den Bronchiolen, sind Clarazellen, Cilienzellen und neuroendokrine Zellen vorherrschend. Im distalen alveolären Bereich enthält das Epithel alveoläre Epitheltyp-1 und Typ-2 Zellen (AEC1- und AEC2-Zellen). Alveoläre Typ-1 Zellen sind im Vergleich zu Typ-2 Zellen seltener, kleiden aber 95% der Alveolaroberfläche aus, indem sie eine dünne flache Plattenepithelzellschicht bilden (Rawlins und Hogan 2006) (Abbildung 2). Sie sind für den Gasaustausch zwischen den Alveolen und den Kapillaren des Blutgefäßsystems verantwortlich. Zudem sind sie gegenüber Verletzungen jeglicher Art sehr empfindlich und besitzen weder Proliferations- noch mitotische Eigenschaften, noch Reparaturmechanismen. Zwischen den AEC1-Zellen eingeflochten liegen die AEC2-Zellen. Ein Hauptmerkmal dieser Zellen sind die im Cytoplasma befindlichen Lamellar-Körperchen. Diese enthalten das Surfactant-Lipid, welches die Oberflächenspannung der Lungenbläschen herabsetzt, somit ein Kollabieren verhindert und für Stabilität im Lungengewebe sorgt. Schäden an Typ-1 Zellen werden durch proliferierende AEC2-Zellen ersetzt, welche sich in AEC1-Zellen differenzieren können (Barkauskas et al. 2013). Typ-2 Zellen sind weniger empfindlich, können jedoch durch erhöhten oxidativen Stress in der Bildung des Surfactants gestört werden (Aso et al. 1976).

Fibroblasten (EpCam⁻/Sca-1^{high}) erhalten die Form, Festigkeit und Integrität des Lungengewebes. Fibroblasten sind, zusammen mit alveolären Epithelzellen, hauptsächlich für den Reparaturprozess nach Lungenschädigung verantwortlich (Sacco

et al. 2004). Alveoläre Epithelzellen können über die Produktion von TGF- β die Proliferation von Fibroblasten sowohl in gesunden als auch in fibrotisch veränderten Lungen modulieren. Zudem sind Fibroblasten an chronischen Entzündungsprozessen maßgeblich beteiligt, bei denen es zur Vernarbung und Fibrose kommt (Hostettler et al. 2008; Giangreco et al. 2009; Giangreco et al. 2002).

Die Lungenfibrose ist eine fortschreitende und tödliche Krankheit, die durch eine übermäßige Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM), wie Kollagen I und III, Fibronectin und Lamin, im Lungenparenchym und im distalen Luftraum gekennzeichnet ist. Bei der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) tritt die übermäßige Produktion und Ablagerung der EZM in Bereichen auf, in denen sich Apoptose-resistente, aktivierte Fibroblasten angesammelt haben (Hardie et al. 2009; Katzenstein und Myers 1998). Diese übermäßige Fibroblastenakkumulation hängt von der Fibroblastenmigration zu der Stelle der Gewebeverletzung und der Invasion der EZM ab (Ahluwalia et al. 2016; Prasse et al. 2006; Huaux et al. 2013).

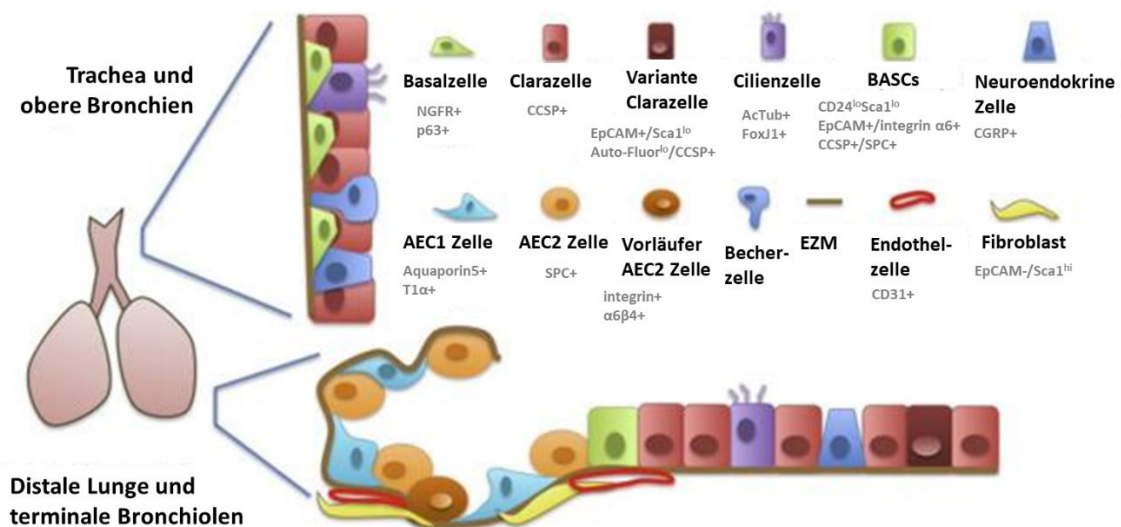


Abbildung 2. Die verschiedenen Zelltypen in der Lunge.

Die proximale Region des murinen Atemwegtrakts ist mit einem Epithel ausgekleidet, das sekretorische Clarazellen, schleimproduzierende Becherzellen und Cilienzellen beinhaltet. In den distalen Bereichen der Bronchiolen sind neben Cilienzellen auch Clarazellen und neuroendokrine Zellen zu finden. Alveolarepithel Typ-1 Zellen (AEC1-Zellen) und SPC positive Alveolarepithel-Typ-2 Zellen (AEC2-Zellen) säumen den Alveolarraum. Hier findet der Gasaustausch statt. Es wurde eine alveolare Vorläuferzelle identifiziert, die nach Verletzungen durch BLM AEC2- und AEC1-Zellen entstehen lassen kann: Integrin α 6 β 4⁺. Am Übergang von der Alveole zur Bronchiole ist eine seltene Zellpopulation, die bronchioalveoläre Stammzellen (BASC). Es wird angenommen, dass BASCs in der Lage sind, sowohl Clara- als auch AEC2-Zelllinien nach einer Verletzung zu generieren. Alveolarepithelzellen und BASCs sind eng mit mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten, der extrazellulären Matrix (EZM) und CD31⁺-Endothelzellen assoziiert. (modifiziert nach Leeman et al. 2014. Lung stem and progenitor cells in tissue homeostasis and disease. Curr. Top. Dev. Biol.).

1.2.2 Die Lungenerkrankung bei A-T

Die hohe Mortalität der A-T ist in der Regel auf die Erkrankung der Atemwege zurückzuführen, die bei den Patienten eine häufige Todesursache darstellt (Schroeder und Zielen 2014). Mehrere Faktoren liegen der erhöhten Anfälligkeit für chronische Lungenerkrankungen zugrunde: wiederkehrende sinopulmonale Infektionen, Immunschwäche oder Aspiration aufgrund des dysfunktionellen Schluckens basierend auf der progressiven Neurodegeneration und der Atemmuskelschwäche (Bhatt et al. 2015) (Abbildung 3). Darüber hinaus können eine defekte Reparatur von Verletzungen, systemische Entzündung und oxidativer Stress zur Entwicklung der Lungenerkrankungen beitragen.

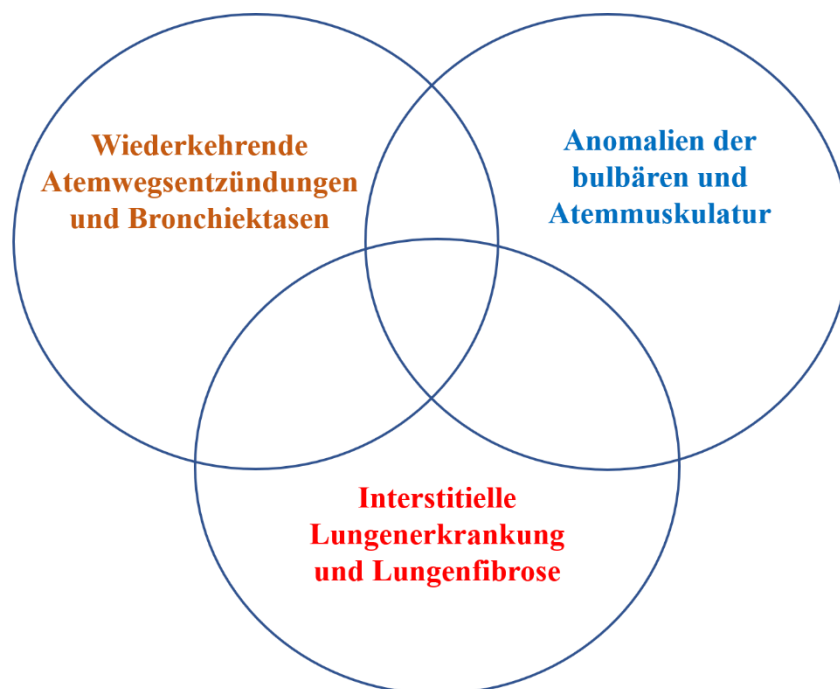


Abbildung 3. Verschiedene Phänotypen der Lungenerkrankung bei A-T.

Bei A-T fußt die Lungenproblematik auf drei verschiedenen Verlaufsformen: Zum einen entwickeln die Patienten aufgrund immer wiederkehrender Atemwegsinfektionen Bronchiektasen (1), interstitielle Lungenerkrankungen und Lungenfibrosen (2). Zum anderen leiden die Patienten unter einer schwachen Atemmuskulatur und einer gestörten Schluckfunktion (3).

Die Patienten leiden an rezidivierenden Infektionen der oberen und unteren Atemwege mit der Entwicklung von Bronchiektasen. Als Folge des Immundefektes entwickeln A-T Patienten eine hohe Anfälligkeit gegenüber wiederkehrenden Lungeninfektionen. Dies ist zum einen dem Fehlen von Serum-IgA und IgG₂ verschuldet aber auch der beeinträchtigt Antikörperreaktion auf Impfstoffe (Canny et al. 1988; Nowak-Wegrzyn et al. 2004). Während der ersten zwei Lebensjahre werden Lungeninfektionen hauptsächlich durch

Viren und in der späteren Kindheit durch gewöhnliche bakterielle Krankheitserreger wie *Hämophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* hervorgerufen (Rotman und Shiloh 1998; Popa et al. 2002). Zudem resultieren rezidivierende Pneumonien in progressiven Bronchiektasen und tragen zum Fortschreiten der Lungenerkrankung bei (Nowak-Wegrzyn et al. 2004). Eine Studie von Bott *et al.* konnte zeigen, dass ein IgA- und IgG₄-Mangel signifikant häufiger bei Patienten mit wiederkehrenden pulmonalen Infektionen auftrat (Bott et al. 2007). Die Untersuchung anderer Fälle ergab allerdings, dass A-T Patienten ohne Immunschwäche durchaus Lungenkomplikationen entwickeln können und *vice versa* können Patienten mit einer Immundefizienz einen normalen Lungenstatus aufweisen (Bott et al. 2007; Yalçın et al. 2002; Yount 1982).

Obwohl der Immundefekt für die progressive Zerstörung der Lunge verantwortlich gemacht wurde, zeigen neuere Untersuchungen, dass nicht nur die Infektion allein für den progressiven Verlust von Lungengewebe verantwortlich ist. Der Immundefekt stellt sicherlich einen wichtigen Faktor dar, bietet aber letztendlich keine befriedigende Erklärung für den Mechanismus der progressiven Zerstörung der Lunge bei A-T zugrunde liegt. Typischerweise findet sich bei den Patienten eine Einschränkung der Thoraxexkursionen, so dass das Atemgeräusch über den basalen Lungenabschnitten kaum zu auskultieren ist, wie bei Patienten mit einer muskulären Störung. Im Spätstadium der Erkrankung kommt es häufig zu einer alveolären Hypoventilation mit CO₂ Retention. Ein Teil der Patienten entwickelt eine chronische interstitielle Lungenerkrankung und pulmonale Fibrosen (Schroeder et al. 2005) (Abbildung 4). Unter dem Begriff "chronisch interstitielle Pneumonien" oder "interstitielle Lungenkrankheiten" (engl. *Interstitial Lung Diseases*, ILD) werden eine große Zahl verschiedenartiger chronischer Krankheiten des Lungenparenchyms, die in einer Fibrose enden, zusammengefasst (Verleden et al. 2001). Das Charakteristikum aller Lungenfibrosen ist der Ab- und Umbau der zarten Lungenstrukturen. Eine überschießende Bindegewebsbildung mit Abnahme der Lungenbläschen führt zu einem Verlust der Gasaustauschfunktion und Dehnbarkeit (Compliance) der Lunge. Die Krankheit nimmt meist einen chronischen Verlauf und endet häufig tödlich (Wilson und Wynn 2009).

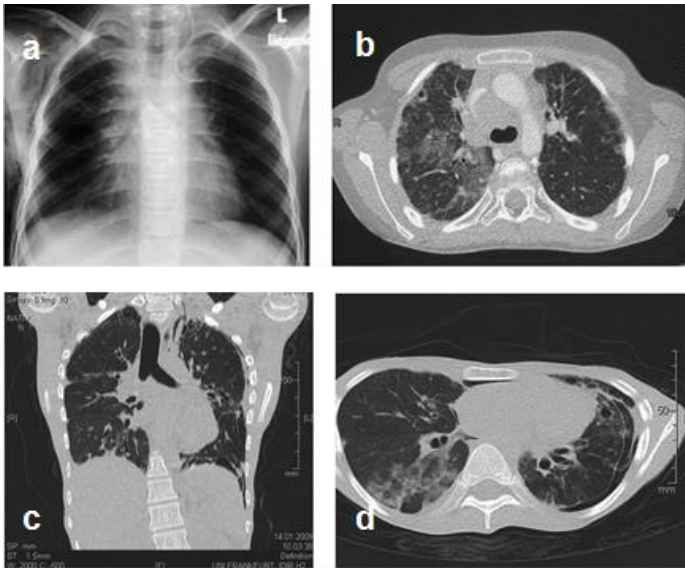


Abbildung 4. 10 Jahre (a, b) und 19 Jahre (c, d) alter A-T Patient mit ILD und pulmonaler Fibrose. In den CT Ausschnitten sind deutlich diffuse Alveolarschädigungen und Verdichtungen durch Verdickungen der intralobulären Strukturen erkennbar (modifiziert nach Pietzner et al. 2013).

Neuere Studien weisen darauf hin, dass eine unterschwellige Entzündung und oxidativer Stress ein zugrundeliegender Mechanismus sein könnte, der zur klinischen Pathogenese der Lungenerkrankung bei A-T führt (McGrath-Morrow et al. 2010a; McGrath-Morrow et al. 2016; Pietzner et al. 2016). McGrath-Morrow *et al.* zeigten die Assoziation von erhöhten IL-8 und IL-6 Serumspiegeln bei A-T-Patienten mit erniedrigten Lungenfunktionsparametern (McGrath-Morrow et al. 2016; McGrath-Morrow et al. 2010a). Zusätzlich zu der Inflammation gibt es vermehrt Hinweise auf die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an der Lungenerkrankung bei A-T.

Barlow *et al.* konnten zeigen, dass ein Verlust des ATM-Proteins oxidativen Schaden in Organen bei *Atm*-defizienten Mäusen verursacht (Barlow et al. 1996). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Eickmeier *et al.* zeigt veränderte Lungenfunktionsparameter und eine gestörte Immunregulation nach Atemwegs-Mukosaschäden in *Atm*-defizienten Mäusen (Eickmeier et al. 2014).

1.3 ATM und oxidativer Stress

Das Genom eukaryotischer Zellen ist den ständigen exogenen Angriffen aus der Umwelt, wie z.B. UV-Strahlung und reaktive Chemikalien bzw. Noxen und endogenen Nebenprodukten des normalen intrazellulären Stoffwechsels (z.B. ROS und fehlerhaft replizierte DNA) ausgeliefert (Friedberg et al. 2006). Die dadurch entstehende genetische Schädigung in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen (DSB) bedroht das Überleben

der Zelle und führt im Laufe der Zeit zu fehlerhaft funktionierenden Organen, Immundefizienz und Krebserkrankungen. Ein DSB entsteht, wenn gleichzeitig auf beiden komplementären DNA-Strängen Brüche entstehen, die nah beieinanderliegen.

Als Schutz der DNA-Integrität besitzt die Zelle Kontrollproteine „Gatekeeper“ wie ATM. Diese Kontrollproteine detektieren geschädigte oder anormale Strukturen der DNA und leiten nach einem Arrest des Zellzyklus, Reparaturmechanismen ein. Der Zelle wird damit Gelegenheit gegeben die defekte DNA zu reparieren, oder das Apoptoseprogramm einzuleiten (Shiloh 2003) (Abbildung 5).

ATM gehört zur Familie der Phosphoinositid-3-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKK) und reguliert zusammen mit Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) mehr als 900 Phosphorylierungsstellen in über 700 Proteinen (Matsuoka et al. 2007; Lavin und Shiloh 1997). ATM wird durch Autophosphorylierung an mehreren Stellen als Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche über den MRN-Komplexes (Mre-11, Rad-50 und Nbs1) aktiviert (Bakkenist und Kastan 2003; Kozlov et al. 2006).

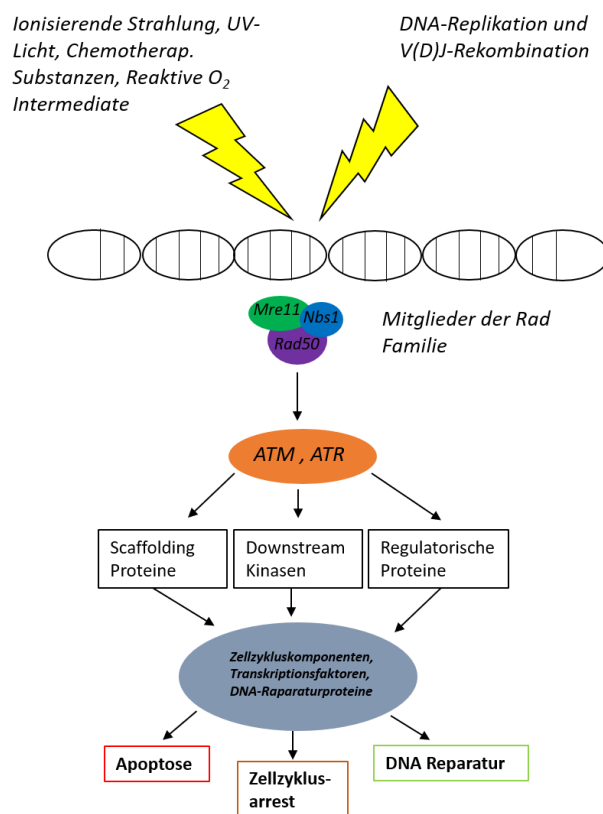


Abbildung 5. Erkennung von DNA-Schäden und Reparaturmechanismen.

Beim Auftreten eines DSBs in der Zelle wird dieser von Sensoren (MRN-Komplex) erkannt, die daraufhin Transduktoren/Mediatoren (ATM, ATR) aktivieren. Durch diese Proteinkinasen werden Effektoren phosphoryliert und die Reparatur des DSB eingeleitet. Um der Zelle genügend Zeit für die Reparatur zur Verfügung zu stellen, wird der Zellzyklusarrest initialisiert. Ist der DNA-Schaden zu gravierend um repariert zu werden, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet.

Interessanterweise wurden Mutationen in Nbs1 und Mre11 sowohl im Nijmegen Breakage Syndrom als auch in der AT-ähnlichen Erkrankung (*AT-like Disorder*, ATLD) gefunden, die phänotypische Gemeinsamkeiten, chromosomale Instabilität, Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und Probleme bei der Reparatur von DNA-Schäden aufweisen.

In der aktivierten Form phosphoryliert ATM eine Reihe von Substraten, die an der Signalübertragung der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt sind (Shiloh 2006). Zu diesen Substraten gehört u.a. das Tumorsuppressorprotein p53, welches den Übergang von der G1- zur S-Phase kontrolliert. Andere wichtige ATM-Substrate sind die Checkpoint-Kinase (Chk2), das Brustkrebsgen BRCA1 und wie weiter oben erwähnt Nbs1 (Brown et al. 1999; Matsuoka et al. 2007; Ward et al. 2001; Buscemi et al. 2004).

ATM spielt zudem eine wichtige Rolle in der Rekombination der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Gene. In B-Zellen von A-T Patienten und *Atm*-defizienten Mäusen wurden Chromosomenanomalien und eine Akkumulation nicht reparierter DNA-Enden

während der V(D)J-Rekombination nachgewiesen. Das deutet auf die Beeinträchtigung der Rekombination in Immunzellen durch ein ATM-Defizit hin (Bredemeyer et al. 2006; Lumsden et al. 2004). Somit könnte die erhöhte Häufigkeit von fehlerhaften Reparaturen während dieser Prozesse die hohe Inzidenz von Lymphomen bei den Patienten erklären (Gumy-Pause et al. 2004). Ebenso konnte in Mäusen, die homozygot für die *Atm*-Knockout-Allele sind (*Atm*^{-/-}), gezeigt werden, dass sie bösartige Thymuslymphome im Alter von 4-6 Monaten entwickeln, was zu verringerten Lebensspannen führt (Barlow et al. 1996; Xu et al. 1996).

Zusätzlich gibt es eine erhöhte Evidenz, dass ROS an der Erkrankung A-T beteiligt sind. Barlow *et al.* zeigten, dass ein Verlust des ATM-Proteins oxidative Schäden in Organen von *Atm*-defizienten Mäusen verursacht (Barlow et al. 1996). Darüber hinaus wurden erhöhte ROS-Spiegel und eine reduzierte antioxidative Kapazität im Serum von Patienten mit A-T gemessen (Reichenbach et al. 1999; Reichenbach et al. 2002).

Frühe Studien zeigten, dass A-T-Fibroblasten anfälliger als normale Zellen für oxidative Schäden sind, die durch H₂O₂ verursacht wurden (Yi et al. 1990) Darüber hinaus waren A-T-Zellen überempfindlich auf ROS, welche durch aktivierte Neutrophile und mithilfe der Xanthinoxidase erzeugt wurden (Ward et al. 1994). Zusammengefasst veranlassten diese Beobachtungen Rotman und Shiloh zu der Annahme, dass die A-T eine Störung der Redox-Homöostase ist und als Sensor für oxidativen Stress fungieren könnte (Rotman und Shiloh 1997b, 1997a).

Die Ergebnisse früherer Studien deuteten darauf hin, dass ATM-defiziente Zellen auch mit unterschiedlichen anomalen Funktionen der Mitochondrien assoziiert sind. Kamsler *et al.* konnte zeigen, dass die Mitochondrien-spezifische Superoxiddismutase (MnSOD) im Cerebrum und Cerebellum von *Atm*-defizienten Mäusen erhöht war (Kamsler et al. 2001). Mehrere andere Studien haben bestätigt, dass das Fehlen von ATM zu oxidativem Stress im Gehirn führt (Browne et al. 2004; Chen et al. 2003; Liu et al. 2005)

Stern *et al.* berichteten darüber hinaus, dass die mitochondriale Atmungskette in *Atm*-defizienten Mäusen im Kleinhirn erhöht und im Großhirn reduziert war (Stern et al. 2002). Ambrose *et al.* untersuchten mitochondriale Funktionen in Lymphoblasten aus A-T-Patienten und obwohl die Forscher fanden, dass konfluente Kulturen von normalen und A-T-Lymphoblasten eine ähnliche Anzahl von Mitochondrien aufwiesen, fanden sie auch, dass A-T-Zellen eine abnorme strukturelle Organisation der Mitochondrien und größere Populationen an Mitochondrien mit verringertem Membranpotential ($\Delta\Psi$) aufwiesen. Zudem konnten sie zeigen, dass die

mitochondriale Atmungsaktivität in ATM-defizienten Lymphoblasten durch die Behandlung mit dem Antioxidans α -Liponsäure wiederhergestellt werden konnte (Ambrose et al. 2007).

Basierend auf der Analyse des 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin (8-OH-dG) im Lungengewebe zeigte sich eine signifikant erhöhte oxidative DNA-Schädigung in *Atm*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Pietzner et al. 2016). Zudem konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Antioxidantien oxidativen Stress reduziert und sowohl die Lebensdauer als auch die neurologischen Defizite dieser Mäuse in gewissem Maße korrigierte (Schubert et al. 2004; Gueven et al. 2006).

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die Funktion von ATM in pulmonalen Epithelzellen nicht gänzlich geklärt. ATM ist an der Regulation des Zellzyklus im Nukleus von Lymphozyten, Fibroblasten und Keimzellen involviert und im Zytoplasma an der Regulation des Redoxstatus beteiligt (Abraham 2001; Shackelford et al. 2001).

Die Rolle von ATM, auch in Bezug auf oxidativen Stress und oxidative Schädigung, wurde in vielen Zellsystemen und Organen bei A-T untersucht (Wu et al. 2017; Yeo et al. 2017; Liu et al. 2005). Die Rolle von ATM in pulmonalen Epithelzellen oder der Lunge ist aber weitgehend ungeklärt.

1.4 Die pulmonalen Reaktionen auf oxidativen Stress

In vielen lebenden Systemen spielen freie Radikale und ROS eine wichtige Rolle, da sie an der Entstehung und der Pathophysiologie vieler Krankheiten beteiligt sind. Eine intakte Zelle ist mit einer Grundausstattung an antioxidativen Schutzmechanismen ausgestattet. Kommt es zu einer Imbalance zwischen anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies und freien Radikalen mit den Schutzmechanismen entsteht in der Zelle oxidativer Stress. Die Lunge ist aufgrund ihrer strukturellen und funktionalen Zusammenhänge als Gasaustauschorgan das Hauptkontaktorgan für inhalative Noxen (MacNee 2001).

ROS und freie Radikale stellen ein besonderes Problem dar: Sie gelangen entweder systemisch über das Blutssystem in die Lunge, sie entstehen vor Ort durch anorganische Reaktionen bzw. aktivierte Entzündungszellen, wie z.B. Alveolarmakrophagen, oder sie werden extern über die Atemluft aufgenommen. Der dadurch entstandene oxidative Stress kann die Lungenzellen permanent schädigen. Ist die Reparatur der Lungenzellen nicht erfolgreich, kann es zu einer chronischen Entzündung und einer pathologischen fibrotischen Strukturveränderung in der Lunge kommen (Poli und Parola 1997).

Es gibt jenseits der unterstützenden symptomatischen Behandlung oder der allogenen Lungentransplantation im Extremfall, keine wirksame Therapie für die akuten Lungeneithelschädigungen unterschiedlichster pulmonaler Erkrankungen. Zu diesen zählen das akute Atemnotsyndrom (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) oder die chronischen Degenerationen von Atemwegs- und Alveolargewebe, wie bei der COPD oder der IPF (Chiumello et al. 2017; Hatipoğlu 2018; Jo et al. 2018).

Kim *et al.* konnte zeigen, dass Patienten mit einem spezifischen Allel des ATM-Gens ein signifikant höheres Risiko an Lungenkrebs zu erkranken aufweisen (Kim et al. 2006). Zudem liegt nahe, dass die permanente unterschwellige pulmonale Entzündung und die erhöhte Anfälligkeit für oxidativen Stress ein zugrunde liegender Mechanismus bei der klinischen Pathogenese bei A-T darstellt (McGrath-Morrow et al. 2010a; McGrath-Morrow et al. 2016; Pietzner et al. 2013; Pietzner et al. 2016). McGrath-Morrow *et al.* zeigten, dass erhöhte Serumspiegel an IL-8 und IL-6 bei A-T-Patienten mit niedrigeren Lungenfunktionsparametern assoziiert waren (McGrath-Morrow et al. 2010a; McGrath-Morrow et al. 2016). Erhöhte IL-6 und IL-8 Serumlevel wurden auch für andere Lungenerkrankungen, wie Mukoviszidose und COPD beschrieben (Moffitt et al. 2014; Su et al. 2016; Eickmeier et al. 2010).

1.5 Die Lungenschädigung im *Atm*-Knock out Mausmodell

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind die pathophysiologischen Vorgänge, die zur Lungenfibrose bei A-T Patienten führen, weitgehend unbekannt. Auch im *Atm*-defizienten Mausmodell ist bis dato das Lungenversagen nicht ausreichend untersucht.

In der *Atm*-defizienten Maus haben Eickmeier *et al.* als erstes die pulmonale Entzündung im *acute lung injury* (ALI) Modell untersucht. In einem nicht-letalen Modell der ALI wurde den Mäusen Salzsäure (HCl) intratracheal in die Lunge appliziert und die Rolle von ATM an protektiven Schutzmechanismen analysiert. Die Arbeit zeigte eine erhöhte Anzahl an Entzündungszellen in der BAL und eine signifikante Erhöhung proinflammatorischer Zytokine in der BALF von *Atm*-defizienten Mäusen nach ALI im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Interessanterweise zeigte die Untersuchung der Lungenfunktion eine signifikante Verschlechterung (erniedrigte Compliance und erhöhte Resistance) in *Atm*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen ohne vorheriger epithelialer Schädigung (Eickmeier *et al.* 2014).

Im Jahr 2016 konnte Pietzner *et al.* zeigen, dass es im Lungengewebe unbehandelter *Atm*-defizienter Mäuse zu einer signifikant erhöhten Akkumulation von 8-hydroxy-2'-desoxyguanosin, ein Marker für oxidativen Stress, ausgelöst durch freie Radikale, verglichen zu Wildtyp-Mäusen kommt (Pietzner *et al.* 2016).

Daten einer noch nicht veröffentlichten Studie zeigen die Migration mesenchymaler Stammzellen nach Transplantation ins Lungengewebe im *Atm* Knock-out Modell mittels Biolumineszenz Imaging. Zu dem Zweck wurde mit Luc⁺-mASCs und GFP⁺-Knochenmarkszellen (KMZ) i.v. über die Schwanzvene von *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen ko-transplantiert und deren Verbleib mittels *in vivo* Imaging nach i.p. Injektion von D-Luciferin zu vorher festgelegten Zeitpunkten bestimmt und im Anschluss quantifiziert. Noch neun Tage nach Transplantation konnten in den Lungen der *Atm*-defizienten Mäuse ein Biolumineszenzsignal gemessen werden. Auch die Untersuchung des Lungengewebes auf RNA-Ebene im Anschluss an das *in-vivo*-Imaging ergab eine 50-fache Erhöhung der Luciferase Genexpression in *Atm*-defizienten Mäusen verglichen zu Wildtyp-Mäusen (Abbildung 6 a. und b.).

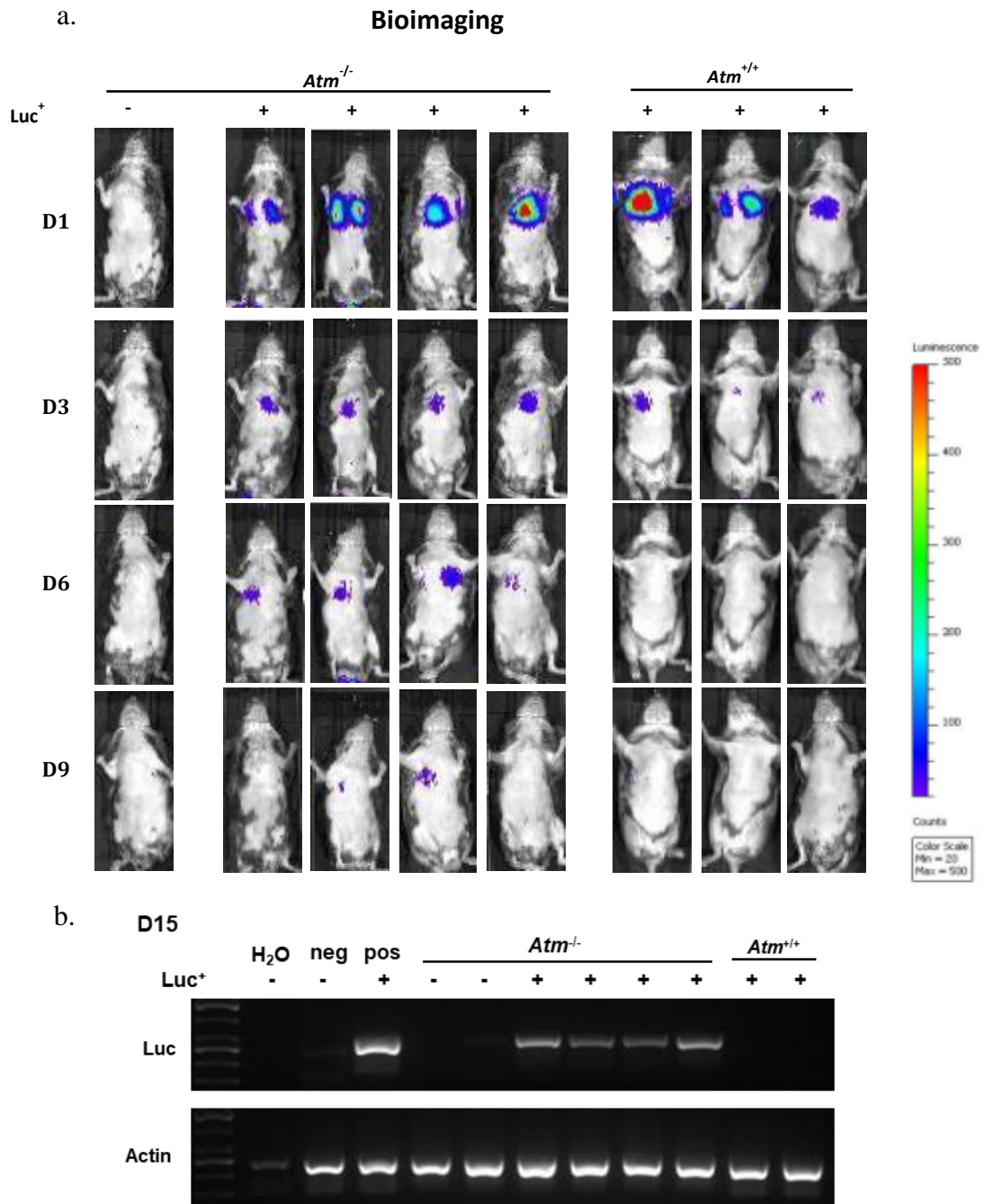


Abbildung 6. Analyse der Migration mesenchymaler Stammzellen in der Lunge von *Atm*-defizienten Mäusen nach Transplantation mittels Bioimaging.

a.) Overlayaufnahmen der *in-vivo*-Biolumineszenzen von *Atm*-defizienten Mäusen (*Atm*^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen (*Atm*^{+/+}) an verschiedenen Zeitpunkten nach Ko-Transplantation von Luc⁺-mASCs und GFP⁺-Knochenmarkszellen. b.) gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus Lungengewebe 15 Tage nach Transplantation. Als Referenz diente mActβ.

Aus all diesen Daten konnten wir schließen, dass es in der *Atm*-defizienten Maus erste Anzeichen einer pulmonalen Entzündung gibt. Jedoch ist die Lebensdauer der *Atm*-defizienten Maus aufgrund des sich rasch entwickelnden Thymusdrüsentumors auf 4-6 Monate beschränkt (Barlow et al. 1996). Aus diesem Grunde machten wir uns in der vorliegenden Arbeit das Bleomycinmodell zu Nutze, um durch eine direkte Applikation

von BLM in die Lunge eine anfängliche inflammatorische Phase gefolgt von einer fibrotischen Gewebeschädigung in einem Zeitraum von 28 Tagen zu induzieren.

Das Bleomycinmodell stellt ein seit vielen Jahren anerkanntes Modell zur Untersuchung der pulmonalen Schädigung dar. BLM gehört zur Gruppe der Glykopeptid-Antibiotika und wurde 1966 von Umezawa *et al.* aus dem Gram positiven Actinobakterium *Streptomyces verticillus* isoliert (Umezawa *et al.* 1966). BLM wird normalerweise in der Onkologie zur Behandlung von Hodentumoren, Plattenepithelkarzinomen, Hodgkin- und Non-Hodgkinlymphomen eingesetzt. Es wird renal ausgeschieden, besitzt eine Halbwertszeit von 4 Stunden und beeinflusst als Zytostatikum verschiedene Phasen des Zellzyklus (Lazo und Sebtí 1994). BLM wirkt, indem es Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA in Tumorzellen verursacht und dadurch den Zellzyklus unterbricht. Dies geschieht durch Chelatisierung von Metallionen und Reaktion des gebildeten Pseudoenzymes mit Sauerstoff. Dies führt zur Produktion von DNA-spaltenden Superoxid- und Hydroxid-Radikalen (Claussen und Long 1999).

BLM ist ein Medikament zur Behandlung verschiedener Arten von Neoplasmen. Die schwerwiegendste Nebenwirkung von BLM ist die Lungentoxizität, die eine Umgestaltung der Lungenarchitektur und den Verlust der Lungenfunktion induziert und schnell zum Tod führt. In dem Zusammenhang seien diffuse alveoläre Schäden, interstitielle Pneumonien und Lungenfibrosen zu nennen (Sostman *et al.* 1977; Moeller *et al.* 2008).

In der tierexperimentellen Forschung macht man sich diesen Umstand zu Nutze, indem man in Versuchstieren durch direkte Applikation von BLM in die Lunge eine anfängliche inflammatorische Phase gefolgt von einer fibrotischen Gewebeschädigung induziert. Die Verwendung von BLM als Induktor der Lungenfibrose wurde zuerst 1976 von Friedman *et al.* in Hunden beschrieben (Fleischman *et al.* 1971), später in Mäusen (Adamson und Bowden 1974), Hamstern (Snider *et al.* 1978) und Ratten (Thrall *et al.* 1979).

BLM verursacht in kurzer Zeit nach intratrachealer Gabe entzündliche Reaktionen, wie die Erhöhung proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ) gefolgt von erhöhter Expression der pro-fibrotischen Marker wie TGF- β , Fibronectin und Procollagen-1. Der Übergang von der anfänglichen proinflammatorischen Phase hin zu fibrotischen Gewebeveränderungen geschieht ungefähr neun Tage nach BLM-Gabe (Chaudhary *et al.* 2006).

Interessanterweise wurden im Mausmodell bemerkenswerte Unterschiede hinsichtlich der Anfälligkeit in der Entwicklung einer Lungenfibrose beobachtet. Während

C57Bl/6-Mäuse gute Responder im Hinblick auf die Entwicklung einer BLM-induzierten Lungenfibrose sind, sind Balb/c-Mäuse annähernd fibrose-resistent. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf unterschiedliche Expressionsmuster von Zytokinen und Proteasen/Antiproteasen zurückzuführen (Phan und Kunkel 1992).

BLM verursacht, wie oben erwähnt, eine Entzündungsreaktion, ausgelöst durch eine Überproduktion von freien Radikalen, mit Induktion proinflammatorischer Zytokine und Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen, was in gewisser Weise einer akuten Lungenverletzung ähnelt (Adamson 1976; Hay et al. 1991). Die hierbei induzierten Lungenläsionen ähneln derjenigen beim Menschen, daher kann das Bleomycinmodell repräsentativ für alle inflammatorisch ausgelösten Formen der Lungenfibrose (idiopathische Lungenfibrose, exogen-allergische Alveolitis und Sarkoidose) angesehen werden (Hay et al. 1991).

1.6 Ziele der Arbeit

Eine der charakteristischen Eigenschaften von A-T sind wiederkehrende und chronische Atemwegserkrankungen, die zu einer erheblichen Morbidität und Mortalität führen. Mehrere Faktoren wurden beschrieben, die der erhöhten Anfälligkeit für chronische Lungenerkrankungen zugrunde liegen, einschließlich der Reparatur von abnormen Verletzungen, systemischer Entzündung und oxidativem Stress. Darüber hinaus können wiederkehrende sinopulmonale Infektionen, Immunschwäche, Aspiration sowohl aufgrund des dysfunktionellen Schluckens, als auch der neurodegenerativen Progression und Atemmuskelschwäche zur Entwicklung einer Lungenerkrankung beitragen (Bhatt et al. 2015). Die Lungenerkrankung bei A-T entwickelt sich im Laufe der Zeit und viele der Patienten sind im zweiten Lebensjahrzehnt mit Bronchiektasen, chronischen Entzündungen und Lungenfibrose konfrontiert. Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden, und eine Progression ist schwer zu modellieren, aber eine gestörte Detektion und Reparatur von DNA-Schäden und eine Sensitivität gegenüber ROS müssen als kausale Faktoren für Atemwegserkrankungen in A-T betrachtet werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die bronchoalveoläre Sensitivität gegenüber ROS und ROS-induzierten DNA-Schäden im *Atm*-defizienten Mausmodell zu untersuchen. Um eine experimentelle Entzündung und fibrotische Veränderungen zu induzieren wurde BLM eingesetzt und den Mäusen oropharyngeal verabreicht. Nach der Analyse der verschiedenen Lungenzellpopulationen und deren oxidativen Status bei den *Atm*-defizienten Mäusen, sollte die Progression der Entzündung und der fibrotischen

Veränderungen nach BLM-Gabe mit molekularbiologischen und histochemischen Methoden analysiert und mit gesunden Wildtyp Mäusen verglichen werden. Um einen Bezug zur Klinik herzustellen sollten zudem Untersuchungen der bronchoalveolären Lavage und der Lungenfunktion bei den Tieren durchgeführt werden. Des Weiteren sollten Experimente an primären murinen Lungenzellen und einer humanen Lungenzelllinie (A-549) helfen den zugrundeliegenden Mechanismus der ROS-induzierten Schädigung von BLM auf das Lungenepithel bei der A-T zu klären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen die Hypothese stützen, dass ATM eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von oxidativem Stress und Lungenfibrose spielt und zur Aufklärung des Ursprungs der Lungenerkrankung und ihrer Progression bei A-T beitragen um die Entwicklung therapeutischer Interventionen zu unterstützen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Die *Atm*-defiziente Maus

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden am *Atm*-Knock out Mausmodell (Inzuchtlinie *129SvEv*) durchgeführt, welches phänotypisch das Krankheitsbild des humanen genomischen Instabilitätssyndroms Ataxia Teleangiectasia in großen Teilen widerspiegelt. Diese Tiere wurden im Labor von Dr. A. Wynshaw-Boris durch homologe Rekombination generiert (Barlow et al. 1996), der Arbeitsgruppe um Prof. R. Schubert zur Verfügung gestellt und in der Zentralen Forschungseinrichtung der Uniklinik Frankfurt seit mehr als 10 Jahren durch weitere Inzucht vermehrt.

Alle, in der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten Tierversuche, erfolgten nach eingehender Prüfung durch eine Ethikkommission und wurden durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Aktenzeichen FK/1001). Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in individuell ventilierten IVC Käfigen. Die Tiere hatten während der gesamten Zeit freien Zugang zu Wasser und Haltungsfutter (Sniff, Soest, Deutschland).

2.1.2 Zelllinien

- Humane Lungenkarzinomzelllinie A-549 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland)
- Murine primäre Alveolarepithelzellen aus *Atm*-defizienten Mäusen und Wildtyp-Tieren

2.1.3 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Einbettmaschine	HistoStar	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Brutschrank	B 5060 BE-CO2	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer	Accuri C6	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
	FACS Verse	

Gerät	Typ	Hersteller
GentleMACS™ C-Tube		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
GentleMACS™ Dissociator		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Gewebeeinbettautomat	Shandon Excelsior ES	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
FlexiVent	FX1	Scireq Inc., Montreal, Kanada
Mikroskop, invertiert	Axio Observer Z1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop	BX51	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Kamera	AxioCamMRm AxioCam ICc1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 10	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Kamera	ISH500 Adapter	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrotom	RM2235	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
NanoDrop	Spectrophotometer ND-1000	peQLab, Erlangen, Deutschland
Sterile Werkbank	Biosafe 2	Ehret GmbH, Deutschland
Sterile Werkbank	Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler	Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Vortexer	VortexGenie2	Scientific Industries, New York, USA

Gerät	Typ	Hersteller
Waage	Universal	Satorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Daeglef Platz KG	Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge	Varifuge 3.0	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge 13	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zytozentrifuge	Cytospin	Thermo Scientific Shandon, Dreieich, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmaterial und Glas

Material	Hersteller
Becherglas	Schott AG, Mainz, Deutschland
Durchflusszytometer-Röhrchen	Corning Incorporated, Lowell, USA
Einbettkassetten	Sanowa, Leimen, Deutschland
Falcon	Corning Incorporated, Lowell, USA
Faltenfilter	Macherey-Nagel, Weilmünster, Deutschland
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Schott AG, Mainz, Deutschland
Messer Mikrotom	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
Objektträger, Superfrost Plus	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Pipet-Boy, Accu-jet-Pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Stripetten	Corning Incorporated, Lowell, USA
Vicrylfaden, VICRYL Plus 0-2	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Venenfunktionsbesteck, Butterfly, Safety-Multifly-Set	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Material	Hersteller
Wiegeschälchen, quadratisch, 7 ml	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zählkammer, Neubauer	Optik Labor, Deutschland
Zellkulturplatten (6-, 24- und 96-Well)	Corning Incorporated, Lowell, USA
Zellsieb, 45 µm	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Zellsieb, 70 µm	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Zytofugenfilter	Tharmac, Deutschland

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	BBraun, Melsungen, Deutschland
Bleomycin sulfate f. <i>in vivo</i> Versuche	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bleocin™ f. Zellkultur	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAPI Solution	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
DCF Diacetat	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Dispase	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM/Hepes	Gibco by Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
DNase	Stemcell Technologies, Köln, Deutschland
DPBS	Sigma, Steinheim, Deutschland
EDTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol 70 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eukitt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eosin G 0,5 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fibronectin	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Fixierungspuffer, BD Cytifix	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isufluran, Forene	Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland

Kaliumhydrogenkarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketamin	CuraMed GmbH, Karlsruhe, Deutschland
KU55933 (ATM-Kinase Inhibitor)	Selleckchem, München, Deutschland
Low Melt Agarose	Bio&Sell, Nürnberg, Deutschland
Masson's Trichrome Färbekit	Polysciences, Inc., USA
May-Grünwald-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Meyer's Hämatoxylin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium, bromid)	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
NaCl-Lösung 0,9 %	BBraun, Melsungen, Deutschland
Paraffin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS, Dulbecco's 1x	Gibco by Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco by Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Rompun (Xylazin)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
VE-821 (ATR Inhibitor)	Selleckchem, München, Deutschland
XTT (sodium 2,3,-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Xylocain Pumpspray	AstraZeneca, Wedel, Deutschland
Xylol	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

2.1.6 Antikörper

Methode	Antikörper	Isotyp	Klon	Fluorochrom	Hersteller
FACS	SP-C	Kaninchen IgG		Alexa Fluor 647	Bioss
	Sca-1	Ratte IgG _{2a} , κ	D7	PE	Miltenyi Biotec
	CD16/32		93	purified	Biolegend
	γH2AX (pS139)	Maus IgG ₁ , κ	N1-431	Alexa Fluor 488	BD Pharmingen
	CD326 (Ep-CAM)	Ratte IgG _{2a} , κ	G8.8	PE/Cy7	Biolegend
	CD31	Ratte IgG _{2a} , κ	MEC 13.3	APC	BD Pharmingen
	CD45	Ratte IgG _{2b} , κ	30-F11	APC	BD Pharmingen

2.1.7 Kits

Masson's Trichrome Staining Kit, Polysciences, Inc., USA

OxiSelect™ Comet Assay Kit von Cell Biolabs

2.1.8 Software

Axiovision Rel. 4.7.2

GraphPad Prism 5.0

FACSSuite Version 1.0.6

2.1.9 Puffer und Lösungen

ACK-Lysepuffer

4,15 g Ammoniumchlorid

0,5 g Kaliumhydrogencarbonat

0,019 g Ethylendiamintetraessigsäure

Auf 500 ml Aqua dest. auffüllen, pH 7,27

Kulturmedium für murine Lungenzellen

10 % FCS

1 % Pen/Strep

1 % MEM

1:500 β -Mercaptoethanol

in DMEM (4,5 g/l Glucose)

Kulturmedium für A-549 Zellen

10 % FCS

1 % L-Glutamin

1 % Pen/Strep

in DMEM (4,5 g/l Glucose)

PBS 10x, (pH 7,2)

9,6 g PBS

in 100 ml Aqua dest.

4 % PFA

450 ml Aqua dest.

20 g Paraformaldehyd

2 N NaOH

50 ml 10x PBS

TBE-Elektrophoresepuffer

10,8 g Tris

5,5 g Borsäure

0,93 g EDTA

mit H₂O auf 1l auffüllen

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von murinen Lungenzellen

Die Isolation der Lungenzellen erfolgte aus 8-10 Wochen alten *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen nach Corti *et al.* (Corti et al. 1996). Die hierzu benötigte 1%-ige Low Melting Agarose wurde nach Herstellerangaben angesetzt, bei -20 °C eingefroren und kurz vor Versuchsbeginn bei 70 °C im Thermomixer verflüssigt. Die Dispase wurde bei Raumtemperatur aufgetaut.

Der Thorax, der zuvor mittels Isofluranüberdosis getöteten Mäuse, wurde durch einen medianen Bauchschnitt eröffnet und das Herz und die Lunge durch entfernen des Sternums und einem Teil der Rippen freigelegt. Anschließend erfolgte ein Entlastungsschnitt am Herzohr und das Spülen der Lunge mit 20 ml PBS durch Einführen einer Butterflykanüle in den rechten Herzventrikel (Lungenkreislauf). Daraufhin wurde die Trachea freigelegt und es erfolgte ein Schnitt der selbigen zwischen zwei Trachealknorpel mithilfe einer Mikropräparationsschere und das Einführen eines bis auf 2 cm stumpf gekürzten humanen Venenkatheters mit 21G. Dieser wurde mithilfe eines Vycrilfadens (2-0) in der Trachea fixiert und eine 1 ml Spritze mit 1,5 ml Dispase (37 °C) und anschließend mit 0,5 ml Agarose appliziert. Nach dem Erhärten der Agarose wurde die Lunge sauber freipräpariert, entnommen und in ein Falcon mit 3 ml 37 °C warmer Dispase überführt, welcher im Anschluss für 40 min auf einem Rolltisch inkubierte.

Die nächsten Arbeitsschritte beinhalteten die Zerkleinerung der Lungen mittels gentleMACS™ Dissociator unter Verwendung der mit 3 ml gentleMACS™ Puffer (5 ml DMEM, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin, 20 mM HEPES, 120 U Dnase) befüllten gentleMACS™ C-Tubes mithilfe des Programms *m_lung_1.01* und *_1.02*. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1800 rpm bei 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen, die resuspendierten Zellen durch einen 70 µm Filter gegeben und der Filter mittels 4 ml DMEM nachgespült. Für die durchflusszytometrische Analyse erfolgte die Zellzählung mittels Neubauerzählkammer und das Einstellen auf 1×10^7 /ml Zellen.

2.2.2 Kultivierung und Erhaltung der humanen Lungentumorzelllinie A-549

Für die Zellkulturarbeiten wurde die humane Lungenkarzinomzelllinie A-549, etabliert von Donald J. Giard 1972 und bezogen von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; Braunschweig, Deutschland) verwendet (Giard et al. 1973). Die adhärent wachsenden Epithelzellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) unter Zusatz von 10 % FCS (Fetal Calf Serum) und 1 % PenStrep (Penicillin/Streptomycin) bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung kultiviert und ab Passage 3 in den Versuchen eingesetzt. Die konfluente Zellkultur wurde ca. alle 3 Tage im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dabei wurde das verbrauchte Zellmedium abgenommen, die Zellen 2-3-mal mit DPBS gewaschen und mit 0,25 % Trypsin/EDTA vom Kulturflaschenboden abgelöst. Dazu wurden sie für 3 min bei 37 °C bis zur Abrundung inkubiert. Die Zell-Trypsin-Suspension wurde mittels vorgewärmten Komplettmedium neutralisiert, die Zellzahl in der Neubauer-Kammer ermittelt und nach einem Zentrifugationsschritt bei 200 x g für 5 min auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt und in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Zur Aufrechterhaltung der Zelllinie wurden die Zellen nach Passage 3 und 6 eingefroren. Dazu wurden die Zellen trypsiniert, neutralisiert und bei 200 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, 2×10^6 Zellen wurden in 1 ml kaltem Einfriermedium (20 % DMSO/FCS) resuspendiert und in vorgekühlte Kryovials überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei -80 °C eingefroren und für die Langzeitaufbewahrung am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff umgelagert.

Das Auftauen und Revitalisieren der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C für ca. 2 min, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Die Zellsuspension wurde in Zellkulturflaschen überführt, die vorgewärmtes Komplettmedium enthielten. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt um restliches DMSO zu entfernen und die Zellen im Lichtmikroskop auf Vitalität überprüft.

2.2.3 Ermittlung der Lebendzellzahl

Bei der Bestimmung der Zellzahl wurde eine Färbung der Zellen mit Trypanblau zur Testung der Lebensfähigkeit der Zellen durchgeführt. Der anionische Azofarbstoff färbt selektiv tote Zellen an, die somit bei der Zellzählung aufgrund der Blauverfärbung in der Neubauer-Zählkammer ausgeschlossen werden können.

2.2.4 Proliferationsassay

Mit Hilfe des XTT Assays wurden die metabolische und zelluläre Aktivität in primären murinen Lungenzellen (Fibroblasten) nach 24-stündiger Stimulation mittels BLM (Bleocin™) gemessen. Zu dem Zweck wurden die Zellen mit einer Dichte von 25.000/Well in 96-Well Platten ausgesät und mit verschiedenen Bleomycinkonzentrationen [1 mU, 10 mU und 100 mU] in Triplikaten für 24 Stunden stimuliert. 70 % Ethanol diente dabei als Positivkontrolle.

5 ml des XTT Labelingreagenz wurden mit 0,1 ml des Elektronencouplingreagenz gemischt und die Zellen für weitere 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Metabolisch aktive Zellen reduzieren das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz XTT zu wasserlöslichem Formazan. Dies wurde kolorimetrisch bei einer Extinktion von 420 nm gemessen (Scudiero et al. 1988).

2.2.5 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in A-549 Zellen und murinen Lungenzellen

Murine Lungenzellen, isoliert aus 8–10 Wochen alten *Atm*^{+/+} und *Atm*^{-/-} Mäusen wurden ab Passage 5 mit 10 µM BLM für 24 Stunden stimuliert, gewaschen und mit 10 µM DCF (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) Diacetat gelöst in 1 ml PBS für 15 min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit folgenden Oberflächenmarkern angefärbt: PE-Cy7- α CD326, A647- α SP-C und PE- α Sca-1. Anschließend erfolgte die Messung auf einem BD FACSVerse Durchflusszytometer. In den murinen Lungenzellen wurde das FITC Signal des DCFs in lebenden Zellen genauer in SP-C⁺ und CD326⁻Sca-1⁺ Zellen untersucht, da diese Subpopulationen alveoläre Typ 2 Zellen und Fibroblasten darstellen.

Die Adenokarzinomzelllinie A-549 wurde entweder mit oder ohne ATM-Kinase Inhibitor KU55933 [10 µM] eine Stunde vor BLM Stimulation [100 mU] behandelt und das DCF Signal mittels Durchflusszytometer untersucht. Hierfür wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt.

2.2.6 Messung von DNA Schädigungen mittels γ H2AX Assay

Die für die DSB-Erkennung wichtigste Funktion von ATM ist die Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139 (Kinner et al. 2008). Um dies zu untersuchen wurden aus *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen Lungenzellen isoliert und für 3 h bzw. 24 h mittels 10 mU BLM in 24-Well Platten stimuliert. Die Adenokarzinomzelllinie A-549 wurde mit oder ohne 10 µM ATM-Kinase Inhibitor (KU55933) eine Stunde vor BLM-Stimulation

[100 mU] behandelt und die Analyse von γ H2AX nach dem Protokoll von Tanaka *et al.* mit leichten Modifikationen durchgeführt (Tanaka *et al.* 2009). Die Zellen wurden mittels Accutase (10 min bei 37 °C) vom Plattenwellboden gelöst, mit 1 ml PBS gewaschen und mit 100 μ l BD Cytotfix für 10 min bei RT fixiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Permeabilisierung der Zellen für 5 min bei RT mittels 100 μ l eiskaltem BD Phosflow Perm Buffer III. Daraufhin wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und zur Verhinderung unspezifischer Bindungen von Seiten des Antikörpers mit 3 % FCS/PBS für 30 min bei RT inkubiert. Der anti- γ H2AX Antikörper (Alexa Fluor 647 Mouse anti-H2AX pSer139) wurde 1:10 verdünnt und für 60 min bei RT auf den Zellen belassen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 100 μ l PBS gewaschen, final in 300 μ l PBS/1 mM EDTA, zur Verminderung der Aggregatbildung, aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Auswertung diente die FACSuite Software.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden A-549 Zellen in Chamber Slides ausgesät. Nach einer 48-stündigen Kultur wurden die Zellen für 24 h mit 100 mU BLM und 10 μ M ATM-Kinase Inhibitor KU55933 stimuliert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit 1:10 Alexa Fluor 488 Maus-Anti-H2AX (pSer139) angefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI (blau fluoreszierende DNA-Färbung) und anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.7 Comet Assay

Zur Untersuchung der DNA Schädigung auf Einzelzellebene in der humanen Adenokarzinomzelllinie A-549 wurden das OxiSelect™ Comet Assay Kit von Cell Biolabs nach Herstellerangaben benutzt. Diese Methode wurde erstmalig von Rydberg 1976 beschrieben und 1984 erläuterten Östling und Johanson die Wanderung von DNA in auf Objektträgern gegossenen Gelen (Ostling und Johanson 1987). Es gibt zwei verschiedene Arten den Comet Assay durchzuführen. Mit dem alkalischen Comet Assay werden Einzel- und Doppelstrangbrüche nachgewiesen wobei durch den hohen pH-Wert (>13) die DNA denaturiert und somit auch Einzelstrangbrüche sichtbar gemacht werden können. Die zweite Art ist der neurale Comet Assay in dem nur Doppelstrangbrüche sichtbar gemacht werden können. Aufgrund von nur schwachalkalischen Bedingungen (pH 9) bleiben die Paarungen der Basen bei der Zellyse erhalten. In dieser Arbeit wurde letztere Variante zur Untersuchung von BLM-induzierten Doppelstrangbrüchen verwendet.

Zu dem Zweck wurden A-549 Zellen auf 24-Well Platten mit einer Zelldichte von 2×10^5 /Well ausgesät und 48 h vor BLM Stimulation ruhen lassen. Die Zellen wurden mit 10 μ M KU55933 eine Stunde vorbehandelt und mit 10 mU BLM für 3 h bei 37 °C inkubiert.

Als Kontrolle dienten unstimulierte A-549 Zellen ohne ATM-Kinase Inhibitor. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Zuhilfenahme eines Zellschabers abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden auf einer Zelldichte von 10^5 /ml eingestellt, 1:10 mit der zuvor bei 95 °C aufgekochten und auf 37 °C abgekühlten Agarose versetzt und auf die Wells der OxiSelect™ Objektträger aufgebracht. Nach einer 15-minütigen Trocknungszeit bei 4 °C wurden die Objektträger für 60 min in Lysepuffer gelegt und anschließend für 30 min in Alkalipuffer überführt, was zur Entknäulung der Tertiärstruktur der DNA diente. Anschließend wurden die Objektträger in die Elektrophoresekammer gelegt und mit TBE-Elektrophoresepuffer bedeckt. Dann erfolgte die Elektrophorese bei 32 Volt für 20 min. Diese bewirkte eine Wanderung der negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung der Anode. Je nach Zahl der DNA-Strangbrüche entstehen so mehr oder weniger stark ausgeprägte Schweife hinter den Zellen (Abbildung 7). Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Objektträger aus der Kammer entnommen und mehrmals für einige Minuten in destilliertem H₂O und anschließend in 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer Trocknungszeit der Objektträger über Nacht wurden diese mit dem VISTA Green DNA Dye für 15 min angefärbt und anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

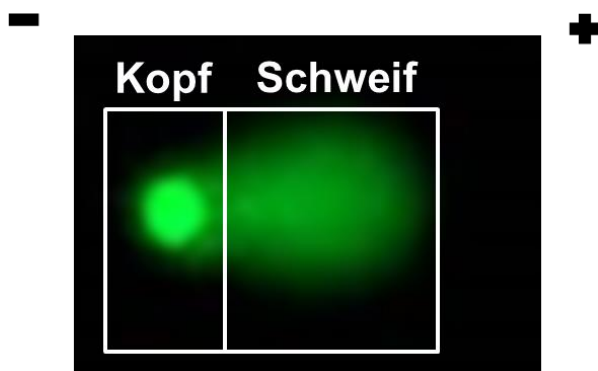


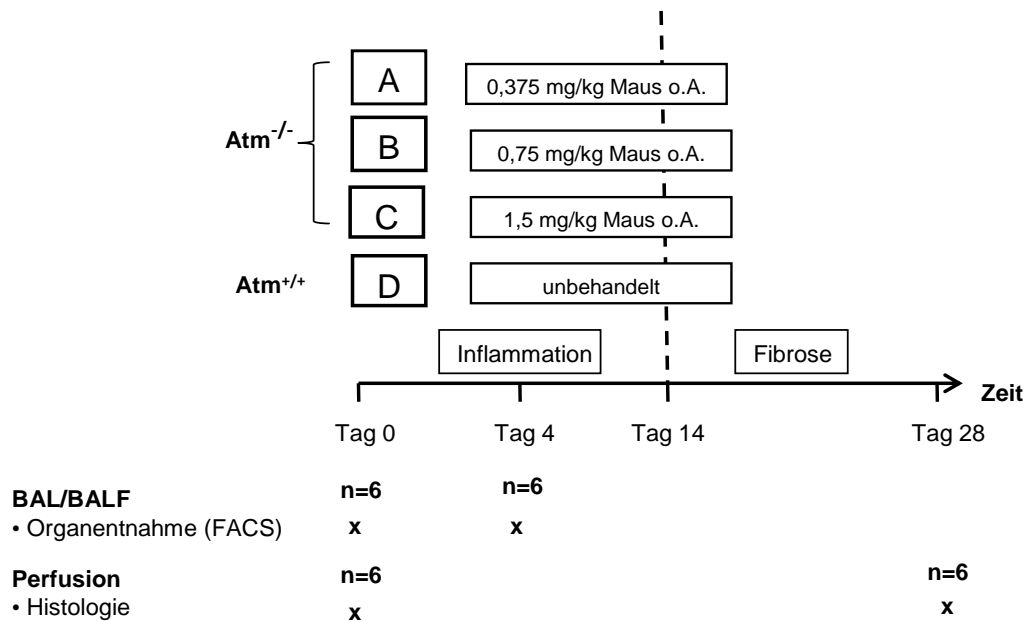
Abbildung 7. Struktur eines Kometen im Comet Assay.

Aufgrund der negativen Ladung der DNA richtet sich der Schweif zur Anode aus.

Die angefärbten Präparate wurden mithilfe eines Auflichtfluoreszenzmikroskops ausgewertet. Pro Objektträger wurden 100 Zellen zufällig ausgewählt und die Kometenschweiflänge (μm) bestimmt. Nekrotische oder apoptotische Zellen, sowie Zellen direkt vom Rand der Objektträger wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

2.2.8 Studiendesign der *in vivo* Versuche

In einer Vorstudie zur Dosisfindung wurden anhand von Literaturrecherche drei Bleomycinkonzentrationen ausgewählt und diese *Atm*-defizienten Mäusen oropharyngeal an Tag 0 appliziert (Izbicki et al. 2002). Als Kontrolle dienten unbehandelte Wildtyp-Mäuse. Das Bleomycinmodell ist ein gut untersuchtes und etabliertes Modell zur Nachstellung der idiopathischen pulmonalen Fibrose im Patienten. Es kennzeichnet sich durch zwei distinkte Phasen: In den ersten zwei Wochen nach BLM Applikation tritt das inflammatorische Stadium auf. Darauf folgt die Phase der fibrotischen Umbauvorgänge in der Lunge. An Tag 0 und Tag 4 wurde eine bronchoalveoläre Lavage der Lungen der Tiere durchgeführt und auf Anzeichen einer Inflammation anhand Differenzialdiagnostik und Bestimmung proinflammatorischer Zytokine per CBA untersucht. An Tag 0 und Tag 28 wurden die Lungen mit 4 % Paraformaldehyd perfundiert und histologische Schnitte zur Darstellung fibrotischer Veränderungen im Lungengewebe angefertigt. Die Anzahl der Mäuse pro Versuchszeitpunkt und Gruppe betrug sechs (Abbildung 8). Die Überwachung des Gesundheitszustandes und die Gewichtsmessung erfolgten in der Inflamationsphase täglich und in dem Stadium der Fibrose wöchentlich.



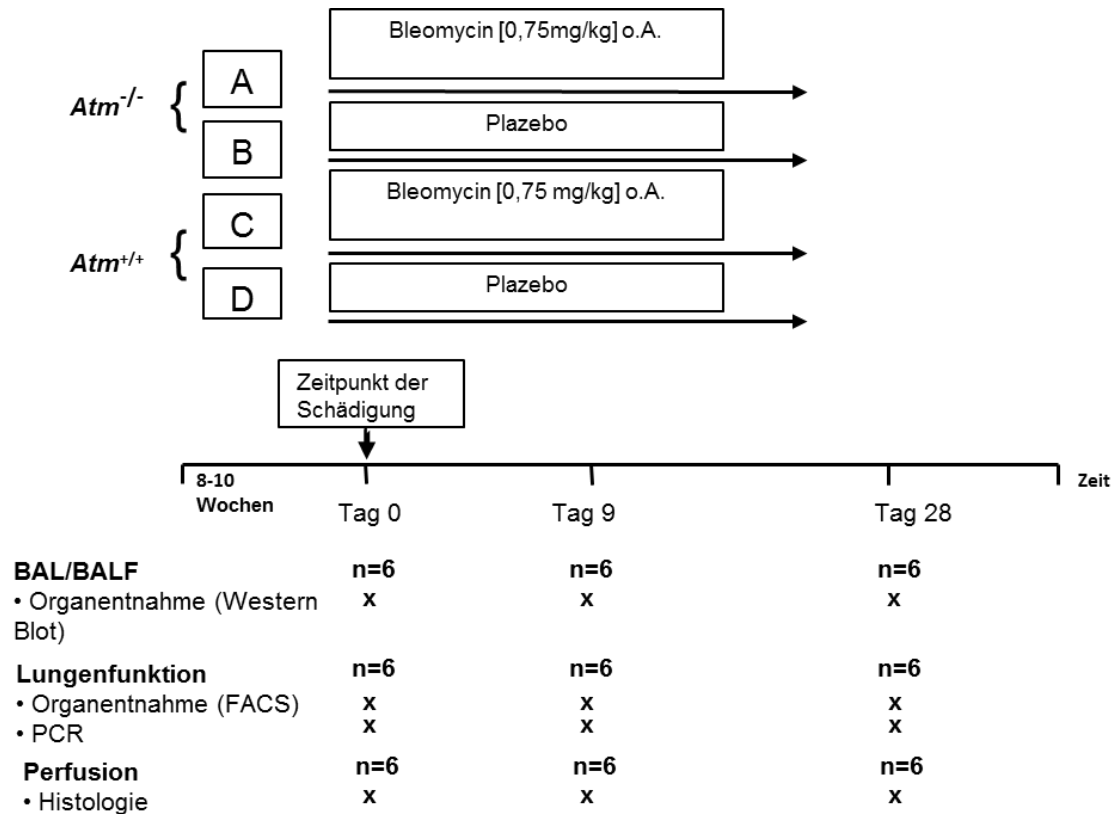
Gewichtsmessung bis Tag 7 täglich
Ab Tag 7 wöchentlich

Abbildung 8. Verlaufsschema des Dosisfindungsversuches.

Applikation verschiedener Bleomycinkonzentrationen (0,375 mg/kg, 0,75 mg/kg und 1,5 mg/kg Körpergewicht Maus) an Tag 0 in *Atm*-defiziente Mäuse. An Tag 4 wurde eine BAL und an Tag 28 eine Perfusion für histologische Untersuchungen durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Wildtyp-Mäuse (n = 6).

Die aus dem Vorversuch ermittelte Dosis von 0,75 mg/kg Körpergewicht Maus wurde im Hauptversuch 8 bis 10 Wochen alten *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen an Tag 0 oropharyngeal appliziert. Als Placebokontrolle diente hierbei 0,9 % Kochsalzlösung, welche sowohl *Atm*-defizienten als auch Wildtyp-Mäusen per oropharyngealer Applikation (siehe unten) verabreicht wurde.

Neun und 28 Tage nach Stimulation wurde ein Lungenfunktionstest mittels mechanischem Ventilator (flexiVent, Scireq, Montreal, Kanada) durchgeführt. Anschließend wurden die Lungen mit 1 ml PBS/0,6 mM EDTA lavagiert. Daraufhin erfolgte eine partielle Perfusion des linken Lungenflügels mittels 4 % Paraformaldehyd. Die Gruppengröße pro Versuchstag und Methode betrug n = 6 um eine ausreichende statistische Relevanz zu erlangen (Abbildung 9).



Gewichtsmessung bis Tag 7 täglich
Ab Tag 7 wöchentlich

Abbildung 9. Verlaufsschema des Hauptversuchs.

Es wurden 0,75 mg/kg KG BLM oropharyngeal in *Atm*-defiziente und Wildtyp-Mäuse an Tag 0 appliziert. An den Tagen 9 und 28 erfolgten eine BAL, eine invasive Lungenfunktion und eine Perfusion der Lunge. Als Kontrollen wurde sowohl *Atm*-defizienten als auch Wildtyp-Mäusen 0,9 %-ige Kochsalzlösung oropharyngeal verabreicht. Die Gewichtskontrolle wurde auch im Hauptversuch im angegebenen Beobachtungszeitraum täglich durchgeführt.

2.2.9 Induktion der Lungenerkrankung/Lungenfibrose durch oropharyngeale Verabreichung von BLM

Die Applikation von Bleomycin sulfate und 0,9 %-iger Kochsalzlösung als Kontrolle erfolgte bei narkotisierten 8-10 Wochen alten Wildtyp- und *Atm*-Knock out Mäusen beiderlei Geschlechts per oropharyngealer Aspiration. Durch Pipettieren der Reagenzien in den Rachen unter gleichzeitigem Verschluss der Nase mittels Pinzette gelangten die Suspensionen in die Lungen der natürlicherweise obligaten Nasenatmer (Vooght et al. 2009).

2.2.10 Invasive Lungenfunktionsmessung mit dem flexiVent-System

Die pulmonale Lungenschädigung wurde mittels invasiver Messung, die mit Hilfe des flexiVent-Systems der Firma Scireq (Montreal, Kanada) durchgeführt wurde, bestimmt. Bei dem flexiVent handelt es sich um eine Kombination aus mechanischer Ventilation und ständiger online Analyse der Atemmechanik. Durch einen computergesteuerten Kolben wird ein oszillierendes Signal erzeugt, das in der Lunge ein charakteristisches Schwingungsmuster hervorruft. So werden Messparameter wie Lungenwiderstand und Compliance (Dehnbarkeit der Lunge) bestimmt.

Aus dem Verhältnis des absoluten Druckunterschiedes und dem absoluten Volumenunterschied ergibt sich die Impedanz. Ein Druckfühler im Gerät misst den Druck und der computergesteuerte Ventilator gibt das Volumen vor. Im Laufe einer Lungenschädigung kommt es zu einem Versteifen und einer verringerten Dehnbarkeit der Lunge. Dies führt zu einem Druckanstieg und somit zu einer gesteigerten Impedanz. Aus der Impedanz lässt sich anhand einer komplexen Lungenfunktionsgleichung das Konstante-Phasen-Modell erstellen, mit dem sich kleinste Veränderungen in der Lungenmechanik errechnen lassen. In dem Konstante-Phasen-Modell können zwei Messgrößen bestimmt werden: der Widerstand (Resistance) und die Reaktanz. Letztere beschreibt die Compliance (1/Elastanz).

Zu Beginn einer Lungenfunktionsmessung wurden die Ventilationsparameter über eine Software, welche während der Messung sämtliche Daten aufnimmt, eingestellt. In der Software können mithilfe eines Template Grundeinstellungen, wie Art und Gewicht des Tieres, Beatmungseinstellungen, Mess- und Skriptfunktionen, vorgenommen werden. Für die Versuchsreihe wurde ein für die Maus optimiertes Skript verwendet (Mouse IV Dose Response rel. B).

Vor Experimentbeginn musste eine Kalibration des Zylinder- und Atemwegsdrucks vorgenommen werden. Mithilfe eines Barometers wurden dem Gerät zwei definierte Druckpunkte, 0 cmH₂O und 20 cmH₂O, für die Zylindereichung vorgegeben. Daraufhin erfolgte die Tubuskalibration, damit innere Widerstände der Schläuche und Trachealkanüle nicht in die Berechnung der Atemmechanik einbezogen wurden. Diese Eichung erfolgte vor der Lungenfunktionstestung jeder Maus und musste einmal, im von der Umgebungsluft geschlossenen und offenen Zustand durchgeführt werden.

Atm-defiziente und Wildtyp-Mäuse wurden an den festgelegten Zeitpunkten nach oropharyngealer Verabreichung von BLM oder isotoner Kochsalzlösung mittels Xylazin (10 mg/kg BW; Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) und Ketanest (100 mg/kg BW;

CuraMed GmbH, Karlsruhe, Deutschland) anästhesiert und nach einer lokalen Anästhesie mittels Lidocain (Xylocain Pumpspray, 10 mg/Sprühstoß, Astra Zeneca, Wedel, Deutschland) tracheotomiert. Die Trachea wurde zwischen zwei Knorpelspangen mittels Federschere eröffnet, eine Kanüle eingebracht und mit Vycrylfaden fixiert. Danach wurde die Maus über das Y-förmige Schlauchstück mit dem FX1 Modul der flexiVent verbunden und die Lungenfunktionsmessungen gestartet. Nach einer kurzen Ventilationseinheit (Tidalvolumen: 10 ml/kg and Frequenz: 2.5 Hz; 150 Atemzüge/min) wurde das Skript gestartet und die aufgenommenen Werte für die einzelnen Lungenfunktionsparameter gemittelt.

2.2.11 Bronchoalveoläre Lavage

Die Analyse der BAL erlaubt einen Einblick in die Zellzusammensetzung der in der Lunge befindlichen Zellen. Zur Gewinnung der BAL wurde ein Trachealschnitt der zuvor narkotisierten Maus angefertigt, die Trachea intubiert und die Kanüle mit Vicrylfaden fixiert. Anschließend wurde eine 1 ml Spritze mit 1 ml kaltem PBS + 0,6 mM EDTA auf den Venenkatheter aufgesetzt, langsam in die Lunge appliziert und unverzüglich wiederaufgenommen. Dies wurde dreimal pro Tier wiederholt. Das zurückgewonnene Volumen (Recovery) wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gesammelt und auf Eis aufbewahrt. Nach einer Zentrifugation (12000 rpm 10 min) wurde der Überstand der ersten Lungenspülung abgenommen und bei -80 °C für Zytokinanalysen mittels Cytometric Beat Array (CBA) aufbewahrt.

Das Zellsediment wurde mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und die Aliquots dabei gepoolt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Erythrozyten mittels 500 µl ACK-Lysepuffer für 2 min inkubiert und die Reaktion mit 1 ml PBS abgestoppt. Im Anschluss eines weiteren Waschschriffs wurde das Zellpellet in 200 µl PBS aufgenommen.

2.2.12 Anfertigung von Zytospins und Giemsa-Färbung der BAL-Zellen

Um eine Differenzierung der BAL-Zellen durchführen zu können wurden diese auf einem Objektträger fixiert und angefärbt. Die Zellen der BAL wurden nach Zentrifugation in 200 µl PBS aufgenommen. Davon wurden 100 µl entnommen und in die trichterförmigen Zytofugen-Probenkammern eingefüllt. Die Probenkammern wurden zuvor auf ein

gestanztes Filterpapier aufgesetzt, mit einem darunter befindlichen Objektträger in Zytofugen-Einsatzklammern eingespannt und in der Zytofuge platziert.

Durch 10-minütige Zentrifugation bei 800 rpm wurden die Zellen auf den Objektträger gebracht und über Nacht bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger mit der May-Grünwald-Giemsa-Lösung gefärbt. Dazu wurde die May-Grünwald-Lösung in Küvetten filtriert, die Giemsa-Lösung im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und anschließend filtriert. Die Objektträger wurden für 8 min in der May-Grünwald-Lösung gefärbt. Danach wurden Farbreste mit Leitungswasser entfernt und die Objektträger erneut 35 min in der Giemsa-Lösung gefärbt. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Objektträger 60 min getrocknet, kurz in Xylol eingetaucht und anschließend eingedeckt. Die unterschiedlichen Zelltypen (Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten) wurden morphologisch unter dem Lichtmikroskop bestimmt, indem 400 Zellen pro Präparat ausgezählt und mittels Excel 2010 die prozentualen und absoluten Zellanteile ermittelt wurden.

2.2.13 Histologie – Perfusion der Lunge

Bevor die Lungen histologisch untersucht werden konnten, mussten sie tracheal perfundiert werden. Dazu wurden der linke Lungenflügel, nach erfolgter Lungenfunktionsmessung und bronchoalveolären Lavage, zentral abgeklemmt. Der rechte Lungenflügel wurde nativ für die Messungen des oxidativen Stresses eingefroren. Das Perfusionsmedium (4 % Paraformaldehyd) wurde in eine 50 ml Spritze eingefüllt und in 20 cm Höhe per Stativ befestigt. Der Drei-Wege-Hahn wurde vorsichtig an die in der Trachea befindlichen Braunüle gesteckt und der Vycrilfaden zur Fixierung erneut zugezogen. Mittels Drei-Wege-Hahn wurde der PFA-Fluss so kontrolliert, dass die Lunge 5-10 Minuten lang gut gefüllt und ausgefaltet blieb. Anschließend wurde die Braunüle gelöst, die Klemme entfernt und die Lunge mitsamt Herz kaudal vom Thorax gelöst. Ösophagus und Gefäße wurden durchtrennt, das Herz entfernt und die Lunge in ein 15 ml Falcon mit ca. 5 ml PFA überführt.

2.2.14 Paraffineinbettung

Die histologischen Untersuchungen fanden an den zuvor lavagierten Lungen statt, welche mit 4 % Paraformaldehyd *in situ* fixiert, aus dem Thorax entfernt und in 4 % Paraformaldehyd zur weiteren Verarbeitung gelagert wurden. Als Vorbereitung auf

die Einbettung der Lungen in Paraffin, wurden sie in Einbettkassetten überführt und in 70 %-igen Alkohol bis zum nächsten Arbeitsschritt belassen. Vor der Durchführung der aufsteigenden Alkoholreihe wurde das Gewebe sorgfältig mit Leitungswasser gespült.

- 70 % Ethanol für 30 min
- 70 % Ethanol für 45 min
- 3 x 96 % Ethanol je 60 min
- 3 x 100 % Ethanol je 60 min
- 3 x Xylol je 60 min
- 3 x Paraplast je 60 min

Am Folgetag wurden die Lungen aus den Einbettkassetten herausgenommen und mit der Anschnittfläche nach unten in gewärmte, mit einer kleinen Menge Paraffin bestückte Metallformen überführt. Daraufhin erfolgte das Erkalten der Form zur Fixierung des Gewebes. Der Deckel der Einbettkassette wurde auf die Metallform gedrückt und mit Paraffin aufgefüllt. Das Aushärten des Paraffinblocks wurde auf Eis durchgeführt, im Anschluss die Metallformen entfernt und die Blöcke bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.15 Paraffinschnitte

Aus den in Paraffin eingebetteten Lungen wurden pro Lunge 5 Dünnschnitte mit einer Stärke von 2 μm angefertigt. Dafür wurden die Gewebeschnitte sorgfältig in Wasser schwimmend mit Hilfe eines Pinsels auf die Objektträger aufgebracht. In einem Wasserbad mit einer Temperatur von 47 °C wurden sie anschließend geglättet und zur Trocknung senkrecht aufgestellt. Die Fixierung wurde durch Wärmezufuhr über Nacht bei 40 °C in einem Ofen vorgenommen.

2.2.16 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um die Inflammation der Atemorgane darzustellen wurden die Lungen nach erfolgter Ventilation mittels flexiVent und bronchoalveolären Lavage mit 4 % Paraformaldehyd (w/v) *in situ* fixiert und mittels Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Dabei erscheint das Chromatin der Zellkerne blau und Intrazellulärsubstanz rosa bis rot.

Dazu werden die Paraffinschnitte mit Xylol und absteigender Alkoholreihe (100 %, 96 % und 70 % v/v) deparaffiniert und mit destilliertem Wasser rehydriert. Anschließend wurden die Objektträger 10 min lang mit Hämatoxylin gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift unter fließendem Leitungswasser und anschließend destilliertem Wasser

erfolgte die Strukturfärbung mittels Eosin für 3 min. Danach wurden die Objektträger für 30 Sekunden mit Leitungswasser gespült und daraufhin mittels aufsteigender Alkoholreihe (96 %, 100 % und Xylol) entwässert. Im Anschluss wurden die Präparate dem Xylol entnommen und mit Eukitt eingedeckt.

2.2.17 Masson-Trichrom-Färbung

Zur Hervorhebung der besonders in der fibrotischen Phase gebildeten Kollagenfasern und Bindegewebe wurden die histologischen Lungenschnitte nach Masson-Trichrom gefärbt. Diese Färbetechnik wurde 1929 von Claude L. Pierre Masson entwickelt und färbt Muskelfasern und Keratin rot, Kollagen und Knochen blau bis grün, das Zytoplasma rosa und die Zellkerne braun-schwarz.

Die zu färbenden Paraffinschnitte wurden mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert (s. Hämatoxylin-Eosin-Färbung). Daraufhin erfolgte die Fixierung mittels Bouin'schen Lösung für 60 min bei 60 °C, Spülen unter fließendem Leitungswasser für 5 min und Färbung der Zellkerne mittels Eisen- und Hämatoxylin-Färbung nach Weigert für 10 min. Nach einem weiteren Waschschriff unter fließendem Leitungswasser wurde die Färbung des Zytoplasmas mittels Biebricher Scharlachsäure-Fuchsin für 5 min durchgeführt. Danach wurde erneut gespült und die Objektträger für 10 min in Phosphomolybdänsäure belassen. Anschließend wurden die Proteinfasern mit Hilfe von Anilinblau sichtbar gemacht, die Objektträger in Aqua dest. gespült und im letzten Schritt für 1 min in 1 % Essigsäure belassen. Bevor die Objektträger eingedeckt werden konnten wurden sie mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

2.2.18 Quantifizierung der Lungenschnitte mittels Ashcroft Score

Die Schwere der Fibrose wurde mittels Lichtmikroskopie beurteilt und für die semiquantitative histologische Analyse, der durch BLM-induzierten fibrotischen Veränderungen, verwendet. Den Fibrosegraden wurde ein mittlerer fibrotischer Schweregrad von 0 (normal) bis 6 (starke Zerstörung) zugeordnet und ein Mittelwert für jeden Objektträger ermittelt (leicht modifiziert nach Ashcroft et al. 1988). Zu dem Zweck erhielten 13 Beobachter mit medizinisch geschultem Hintergrund, hinsichtlich der experimentellen Gruppen verblindet, Fotografien von Lungenschnitten. Sie wurden mit einer Beschreibung des Maßstabs und Beispielfotos versorgt, um sie bei der Auswertung zu unterstützen. Besonders wurde dabei auf die Infiltration von Entzündungszellen, der

Verdickung der alveolären Septen und der Ablagerung von Kollagen im Lungengewebe geachtet.

2.2.18 Cytometric Bead Array

Der *Cytometric Bead Array* (CBA) basiert auf der Kombination von ELISA Technik und Durchflusszytometrie und ermöglicht die Bestimmung mehrerer Zytokine. Zur Untersuchung proinflammatorischer Mediatoren nach BLM Stimulation in den Überständen der BAL, gewonnen aus *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen, wurden BD CBA Flex Sets (BD Biosciences-Pharmingen, USA) für IL-6, TNF- α und CXCL1/KC verwendet. Die gefrorenen Überstände wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, bei 10000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. 20 μ l der Flex Set Standards (0.274-200 pg/ml) und je 50 μ l pro Probe wurden mit 20 μ l Capturebeads, 20 μ l Mouse Detectionreagenz und 100 μ l Enhanced Detectionreagenz pro Well einer 96-Well Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Proben mittels BD FACS Array™ Zytometer (BD Bioscience-Pharmingen, USA) und der FCAP Array Software (BD Bioscience-Pharmingen, USA) analysiert.

2.2.19 Durchflusszytometrie

Die Expression spezifischer Oberflächenmarker zur Charakterisierung primärer pulmonaler Epithelzellen wurde am BD Accuri™ C6 Zytometer oder BD FACSVers durchgeföhrt. Die Zellsuspension, zuvor eingestellt auf $0,2 \times 10^6$ Zellen in 100 μ l, wurde in FACS Röhren überföhrt und zweimal mit PBS gewaschen. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen seitens der hier untersuchten Antikörper wurden die Zellen mit anti-CD16/32 für 10 min geblockt und anschließend mit folgenden Oberflächenmarkern für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur gefärbt: SPC-FITC, CD45-PE, CD326-PECy7, CD31-APC, Sca-1-FITC. Nach ein bis zwei Waschschriften wurden die Proben in 300 μ l aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels FACS Suite Software.

2.2.20 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen der generierten Daten erfolgte mithilfe der GraphPad Prism® 5 Software. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Sie wurden analysiert unter

Verwendung des ungepaarten t-Tests. Für multiple Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die Ermittlung des Signifikanzniveaus p erfolgte mittels t-Test bei normalverteilten Stichproben gleicher Varianz. Das Signifikanzniveau wurde folgendermaßen festgelegt: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

3. Ergebnisse

3.1 Differenzielle Leukozytentypisierung in der BAL

Eickmeier *et al.* untersuchten als erste die pulmonale Entzündung in der *Atm*-defizienten Maus nach pulmonaler epithelialer Schädigung im *acute lung injury* Modell (ALI) (Eickmeier et al. 2014). Nach ALI zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl an Entzündungszellen in der BAL und eine signifikante Erhöhung der Sekretion proinflammatorischer Zytokine.

Wie schon von Eickmeier *et al.* bereits beschrieben, besteht kein Unterschied im prozentualen Anteil in den Gesamtzellen der BAL, der Makrophagen, Neutrophilen oder Lymphozyten in unbehandelten *Atm*-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp *per se* (Abbildung 10 a.-c.) (Eickmeier et al. 2014). Auch die Messung der proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen vor BLM-Applikation (Abbildung 10 d.-f.).

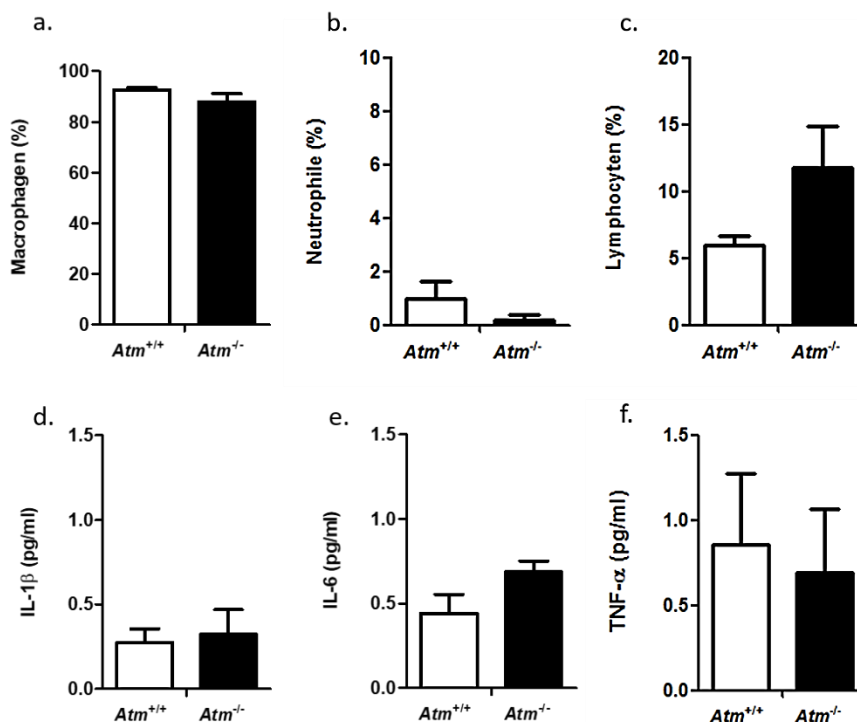


Abbildung 10. Differenzielle Leukozytentypisierung der BAL gewonnen aus unbehandelten *Atm*^{-/-} und *Atm*^{+/+} Mäusen und Sekretion proinflammatorischer Zytokine.

Die Lungen von *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen wurden mittels PBS/0,6 mM EDTA lavagiert und die Zellen nach Anfertigung von Zytospins, angefärbt und anschließend mikroskopisch differenziert (a.-c.). Die Überstände der BAL wurden auf Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β (d.), IL-6 (e.) und TNF- α (f.) mit Hilfe des CBA untersucht (n \geq 5). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

3.2 Charakterisierung primärer Lungenzellen von unbehandelten *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen

Zu den Haupttodesursachen bei A-T zählt die Erkrankung der Atemwege. Rezidivierende pulmonale Entzündungen, die Bildung von Bronchiektasen und die Bildung fibrotischer Veränderungen tragen zum Krankheitsbild der Lunge bei. Fibroblasten sind, zusammen mit alveolären Epithelzellen, hauptsächlich für den Reparaturprozess nach einer Lungenschädigung verantwortlich (Sacco et al. 2004). Im Falle einer Schädigung erfolgt eine übermäßige Ablagerung von Komponenten der EZM und zur vermehrten Proliferation der Fibroblasten, die maßgeblich an Entzündungsprozessen, die zur Fibrose führen, beteiligt sind (Hostettler et al. 2008).

Zur genaueren Untersuchung der pulmonalen Unterschiede wurden Lungenzellen aus *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen isoliert und unter Verwendung eines Durchflusszytometers hinsichtlich ihrer Subpopulationen analysiert. Die Charakterisierung primärer Lungenzellen unbehandelter *Atm*-defizienter zeigten einen signifikanten Anstieg an SPC und EpCam doppelpositiven, Surfactant produzierenden alveolären Epitheltyp-2-Zellen (AEC2) und Sca-1⁺/EpCam⁻ Fibroblasten in *Atm*^{-/-} Mäusen (AEC2: 27,07% ±5,4, *P* <0,05; Fibroblasten: 33,37% ±6,31, *P* <0,05) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (AEC2: 14,83% ±3,68; Fibroblasten: 18,33% ±3,31) (Abbildung 11 b. und c.). Es konnte kein Unterschied im prozentualen Anteil der Endothelzellen (CD31⁺) und hämatopoetischen Zellen (CD45⁺) zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden (Abbildung 11 a. und d.).

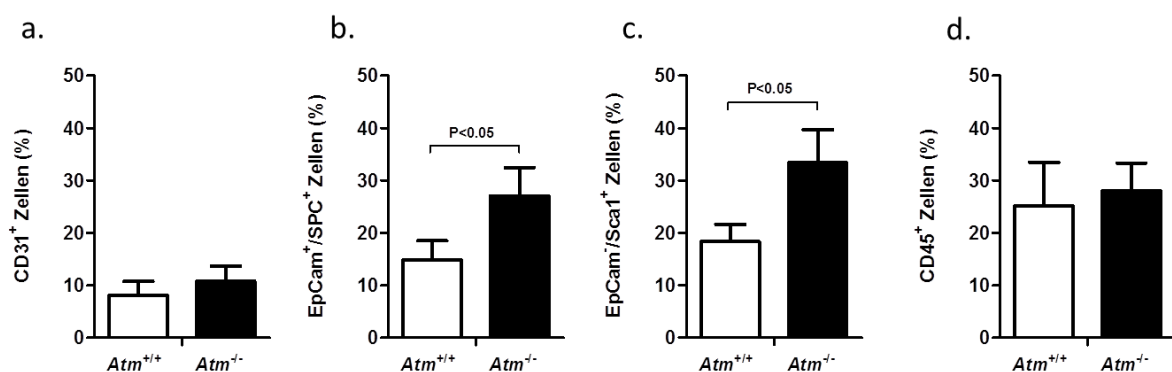


Abbildung 11. Durchflusszytometrische Analyse primärer alveolärer Lungenzellen aus *Atm*-defizienten (*Atm*^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen (*Atm*^{+/+}).

Die Isolation der alveolären Lungenzellen erfolgte an *Atm*-defizienten (n = 5) und Wildtyp-Mäusen (n = 5). Die Lungenzellen wurden oberflächengefärbt für a.) CD31⁺ (Endothelzellen), b.) AEC2 (EpCam⁺/SPC⁺), c.) Fibroblasten (EpCam⁺/Sca-1⁺ und d.) hämatopoetische Zellen (CD45⁺) und daraufhin im Durchflusszytometer untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ±SEM angegeben.

3.3 Oxidativer Stress in alveolären Typ-2 Zellen von *Atm*-defizienten Mäusen

Im Jahr 2016 konnte Pietzner *et al.* zeigen, dass es im Lungengewebe unbehandelter *Atm*-defizienter Mäuse zu einer signifikant erhöhten Akkumulation von 8-hydroxy-2'-desoxyguanosin, ein Marker für oxidativen Stress ausgelöst durch freie Radikale, verglichen zu Wildtyp-Mäusen kommt (Pietzner et al. 2016).

Zur Untersuchung der Rolle von ATM in Bezug auf die Akkumulation des oxidativen Stresses wurden Lungenzellen aus *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen isoliert und der intrazelluläre DCF-Level der Gesamtlungenzellen, alveoläre Typ-2 Zellen und Sca-1⁺ mesenchymale Fibroblasten mittels Durchflusszytometrie im FITC Kanal gemessen. Die Abbildung 12 zeigt auf der linken Seite die Gatingstrategie der Gesamtlungenzellen, der alveolären Epitheltyp-2 Zellen (SPC⁺/EpCam⁺) und der Sca-1⁺/EpCam⁻ Fibroblasten (Abbildung 12 a., c. und e.). Mittig ist das dazugehörige Histogramm als Overlay (Schwarz: *Atm*^{+/+} und Rot: *Atm*^{-/-}) dargestellt. Auf der rechten Seite stellen die Säulendiagramme (Abbildung 12 b., d. und f.) die kombinierten MFI-Daten *Atm*-defizienter Mäuse im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle dar.

Die DCF-Fluoreszenz war in unbehandelten primären Lungenzellen *Atm*-defizienter Mäuse gesamt gesehen zum Wildtyp signifikant erhöht (*Atm*^{-/-} 3399 MFI ±4,38; *Atm*^{+/+} 1440 MFI ±5,23, *P* <0,05) (Abbildung 12 a. und b.). Insbesondere SPC⁺/EpCam⁺ Zellen *Atm*-defizienter Mäuse zeigten erhöhte intrazelluläre DCF-Level im Vergleich zum Wildtyp (*Atm*^{-/-} 3322 MFI ±6,36; *Atm*^{+/+} 2072 MFI ±4,42; *P* <0,05) (Abbildung 12 c. und d.). Die Sca-1⁺/EpCam⁻ Fibroblasten sind hingegen in den *Atm*^{-/-} Mäusen gegenüber den gesunden Kontrollen nicht erhöht (*Atm*^{-/-} 5587 MFI ±7,39; *Atm*^{+/+} 5579 MFI ±7,61) (Abbildung 12 e. und f.).

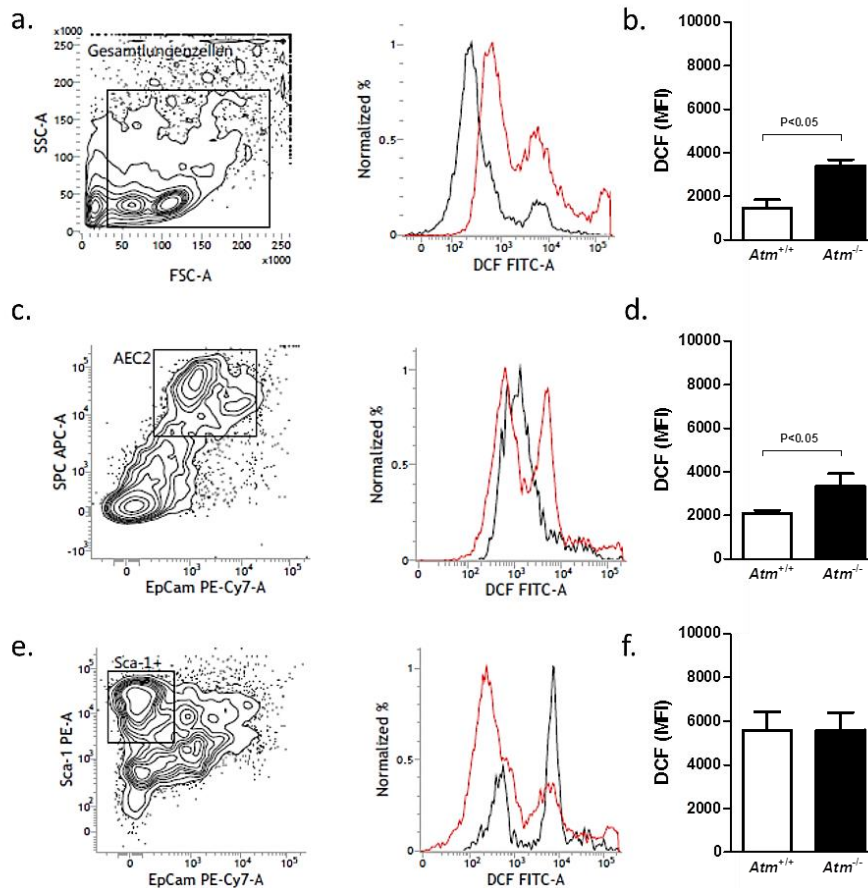


Abbildung 12. Durchflusszytometrische Analysen reaktiver Sauerstoffspezies in primären alveolären Lungenzellen *Atm*-defizienter (*Atm*^{-/-}) und Wildtyp-Mäuse (*Atm*^{+/+}).

Bei primären Gesamtlungenzellen (a.), alveoläre Typ-2 Zellen (AEC2, c.) und Sca-1⁺/EpCam⁻ mesenchymale Zellen (e.) isoliert aus *Atm*^{-/-} (n = 5) und *Atm*^{+/+} (n = 5) wurde mittels Durchflusszytometer die intrazelluläre DCF-Fluoreszenz gemessen. Auf der linken Seite ist die Gatingstrategie im Konturplot und mittig das dazugehörige Histogramm als Overlay (Schwarz: *Atm*^{+/+} und Rot: *Atm*^{-/-}) dargestellt. Die Säulendiagramme (b, d. und f.) stellen die kombinierten MFI Daten *Atm*-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen dar. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ±SEM angegeben. MFI = mean fluorescence intensity.

3.4 Einfluss von Bleomycin auf die Vitalität *Atm*-defizienter Mäuse

Atm-defiziente Mäuse weisen eine, aufgrund der progressiven Entwicklung des Thymustumors, verkürzte Lebensdauer von 4-6 Monaten auf. Diese Spanne ist zu kurz um eine intrinsische pulmonale Entzündung in der *Atm*^{-/-} Maus auszulösen. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit das Bleomycinmodell in der *Atm*-defizienten Maus etabliert.

Um die bronchoalveoläre Sensitivität gegenüber reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativem Stress im Mausmodell gezielt untersuchen zu können, wurde das Zytostatikum BLM *Atm*-defizienten und gesunden Kontrollmäusen oropharyngeal appliziert. Zum einen konnte so die in den ersten zwei Wochen nach Induktion

vorherrschende Inflammation und zum anderen die darauffolgende fibrotische Phase *in vivo* analysiert werden.

Anhand der täglichen Gewichtskontrolle konnten Ergebnisse einer früheren Arbeit von Barlow *et al.* bestätigt werden, die ein signifikant reduziertes Körpergewicht der *Atm*-defizienter Mäuse im Vergleich zum Wildtyp aufzeigte (Abbildung 13) (Barlow et al. 1996).

Bei *Atm*^{-/-} Mäusen konnte eine längere Periode der Gewichtsabnahme anfangend bei sieben bis zehn Tage nach BLM-Instillation verglichen zur Kontrollgruppe aufgezeigt werden (Anfangsgewicht an Tag 0: 18,54 g ±0,11; Tag 7: 17,20 g ±0,17, *P* <0,01; Tag 8: 16,66 g ±0,10, *P* <0,001; Tag 9: 16,69 g ±0,15, *P* <0,01, Tag 10: 17,23 g ±0,59, *P* <0,01). Eine weitere Phase signifikanter Gewichtsabnahme erfolgte an Tag 15 (*Atm*^{-/-}: 17,34 g ±0,48, *P* <0,05) während die *Atm*^{+/+} Mäuse nur an Tag 7 eine signifikant erniedrigte Gewichtszunahme (Anfangsgewicht an Tag 0: 20,69 g ±0,11, Tag 9: 20,54 g ±0,16; *P* <0,01) aufwiesen.

Außerdem zeigt der direkte Vergleich zwischen Initialgewichts an Tag 0 und Gewicht an Tag 28 eine signifikante Differenz des Körpergewichts der *Atm*^{-/-} Mäuse verglichen zur Wildtyp-Kohorte in der angegebenen Beobachtungsperiode an (Abbildung 13 b.).

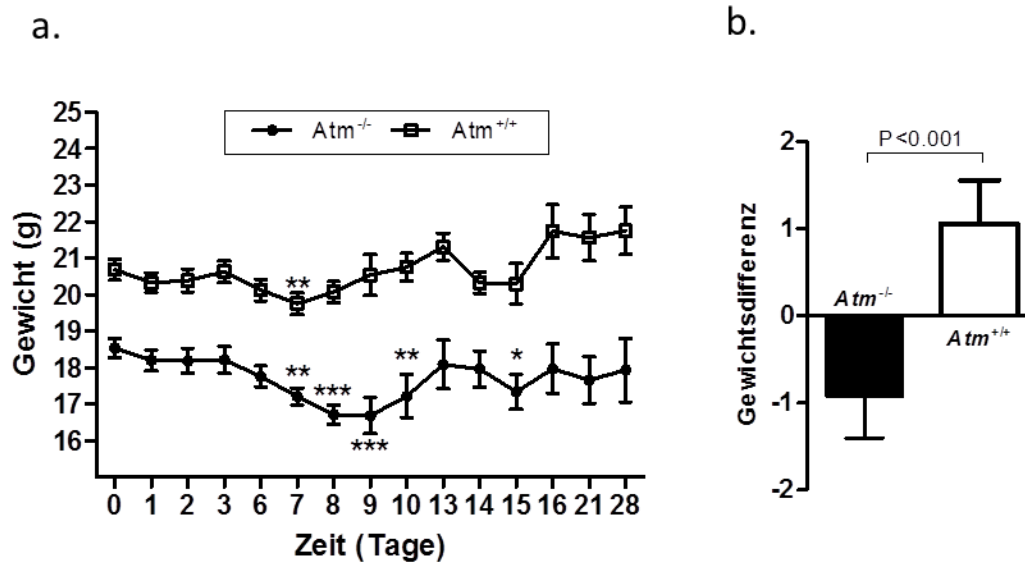


Abbildung 13. Gewichtsentwicklung nach Gabe von BLM in *Atm*-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen im Beobachtungszeitraum von 28 Tagen.

(a.) Die *Atm*^{-/-} und *Atm*^{+/+} Mäuse (n = 8) wurden fünfmal pro Woche gewogen und die Gewichtsveränderung dokumentiert. Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test). (b.) Darstellung der Gewichtsänderung von Tag 0 zu Tag 28 in *Atm*^{+/+} und *Atm*^{-/-} Mäusen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ jeweils bezogen auf das Startgewicht an Tag 0 innerhalb der Genotypen.

3.5 BLM-induzierte pulmonale Inflammation in Lungen *Atm*-defizienter Mäuse nach BLM-Gabe

Um die Rolle von ATM bei der Wirtsantwort gegenüber pulmonalen Entzündungen nach Schädigung der Lunge mittels BLM untersuchen zu können, wurde an Tag 0, 9 und 28 nach BLM-Gabe eine (BAL) bei *Atm*-defizienten und Kontrollmäusen durchgeführt.

Neun Tage nach BLM-Gabe zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der Gesamtzellzahl, der in der BAL befindlichen Zellen aus *Atm*-defizienten Mäusen (*Atm*^{-/-} $118,65 \times 10^3$ Zellen $\pm 15,85 \times 10^3$) im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp-Mäusen (*Atm*^{+/+} $52,67 \times 10^3$ Zellen $\pm 8,12 \times 10^3$, $P < 0,001$) (Abbildung 14. a.). Dies liegt insbesondere an der signifikanten Zunahme neutrophiler Granulozyten, welche ein prominenter Marker für inflammatorische Vorgänge in der Lunge darstellt.

In Lungen BLM behandelter *Atm*-defizienter Mäuse kam es zu einem signifikanten Anstieg der Neutrophilen in der BAL im Gegensatz zu den Wildtyp-Kontrollen (*Atm*^{-/-} $28,07 \times 10^3$ Zellen $\pm 11,43 \times 10^3$, *Atm*^{+/+} $1,95 \times 10^3$ Zellen $\pm 0,83 \times 10^3$, $P < 0,01$). Auch die Makrophagen (*Atm*^{-/-} $83,35 \times 10^3$ Zellen $\pm 7,63 \times 10^3$, *Atm*^{+/+} $49,11 \times 10^3$ Zellen $\pm 7,24 \times 10^3$, $P < 0,001$) und Lymphozyten (*Atm*^{-/-} $6,87 \times 10^3$ Zellen $\pm 3,07 \times 10^3$, *Atm*^{+/+} $1,61 \times$

10^3 Zellen $\pm 0,55 \times 10^3$, $P < 0,05$) waren in der *Atm*^{-/-} Maus signifikant im Vergleich zum Wildtyp am Untersuchungszeitpunkt Tag 9 erhöht (Abbildung 14 b.-d.).

Am Zeitpunkt 28 Tage nach BLM-Instillation konnten wir einen signifikanten Rückgang dieser, für die inflammatorische Phase typischen, Zellen in der BAL beider Genotypen feststellen (Gesamtzellzahl: *Atm*^{-/-} $47,7 \times 10^3$ Zellen $\pm 4,3$, *Atm*^{+/+} $33,7 \times 10^3$ Zellen $\pm 1,9$; Makrophagen: *Atm*^{-/-} $45,3 \times 10^3$ Zellen $\pm 3,6$, *Atm*^{+/+} $32,6 \times 10^3$ Zellen $\pm 1,8$; Neutrophile: *Atm*^{-/-} $1,3 \times 10^3$ Zellen $\pm 0,7$, *Atm*^{+/+} $0,2 \times 10^3$ Zellen $\pm 0,2$; Lymphozyten; *Atm*^{-/-} $1,1 \times 10^3$ Zellen $\pm 0,2$, *Atm*^{+/+} $0,5 \times 10^3$ Zellen $\pm 0,2$) (Abbildung 14 a.-d.).

Zudem war die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, CXCL1/KC und TNF- α neun Tage nach der Gabe von BLM in *Atm*-defizienten Mäusen wesentlich zum Wildtyp erhöht (IL-6: *Atm*^{-/-} $35,78$ pg/ml $\pm 0,38$, *Atm*^{+/+} $6,89$ pg/ml $\pm 0,21$, $P < 0,01$; TNF- α : *Atm*^{-/-} $6,96$ pg/ml $\pm 0,12$, *Atm*^{+/+} $3,97$ pg/ml $\pm 0,13$, $P < 0,05$; KC: *Atm*^{-/-} $17,39$ pg/ml $\pm 0,15$, *Atm*^{+/+} $8,42$ pg/ml $\pm 0,16$, $P < 0,05$). Bis zum Zeitpunkt Tag 28 nach BLM-Induktion konnte in den Überständen der bronchoalveolären Lavagen nur noch geringe Mengen der zu untersuchenden proinflammatorischen Zytokine mittels CBA gemessen werden. Zwischen den beiden Genotypen war hierbei kein Unterschied festzustellen (Abbildung 14 e.-g.).

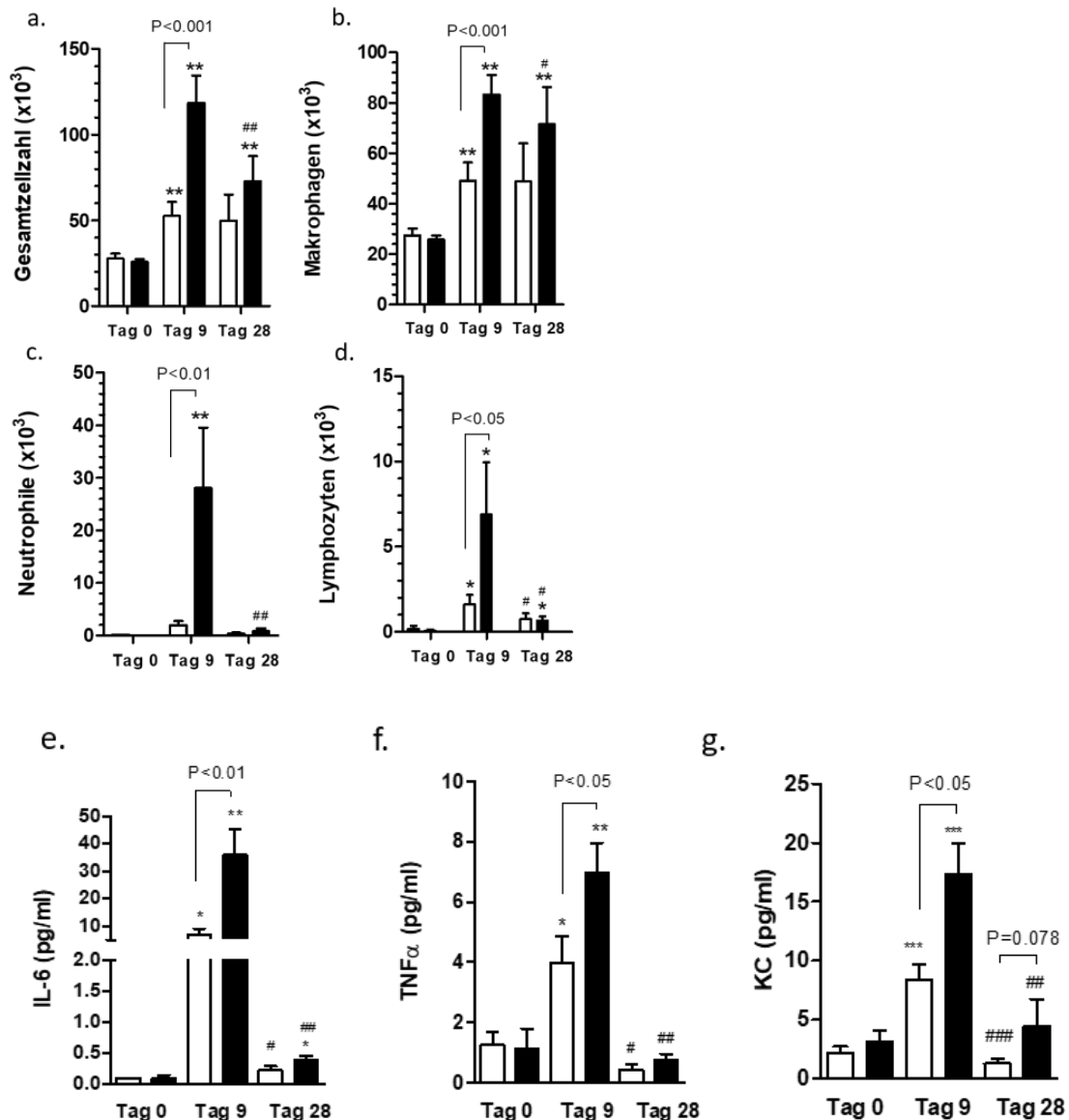


Abbildung 14. Differenzielle Leukozytentypisierung in der BAL gewonnen aus *Atm*^{-/-} und *Atm*^{+/+} Mäusen und Sekretion proinflammatorischer Zytokine.

An Tag 0, 9 und 28 wurden die Lungen *Atm*-defizienter und Wildtyp-Mäuse mittels PBS/1 mM EDTA gespült, die Zellen nach anschließender Färbung mikroskopisch differenziert (a.-d.) und die Überstände der BAL auf Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 (e.), TNF- α (f.) und KC/CXCL1 mit Hilfe des CBA untersucht. Hierbei bezieht sich * im Vergleich zur Baseline (Tag 0) und # im Vergleich zu Tag 9. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$.

Auch in den mittels Hämatoxylin und Eosin angefärbten histologischen Schnitten, welche von allen drei Untersuchungszeitpunkten der jeweiligen Versuchsgruppen angefertigt wurden, zeigte sich neun Tage nach BLM Applikation eine Infiltration von Neutrophilen in das Lungengewebe (Abbildung 15). Vor BLM Gabe wiesen sowohl *Atm*^{+/+} Mäuse als auch *Atm*^{-/-} Mäuse eine normale gesunde Lungenstruktur auf. Die Lungen der *Atm*-defizienten Mäuse spiegelten an Tag 28 nach BLM Induktion eine starke Schädigung der Lungenstruktur verglichen zur Wildtyp-Maus wider.

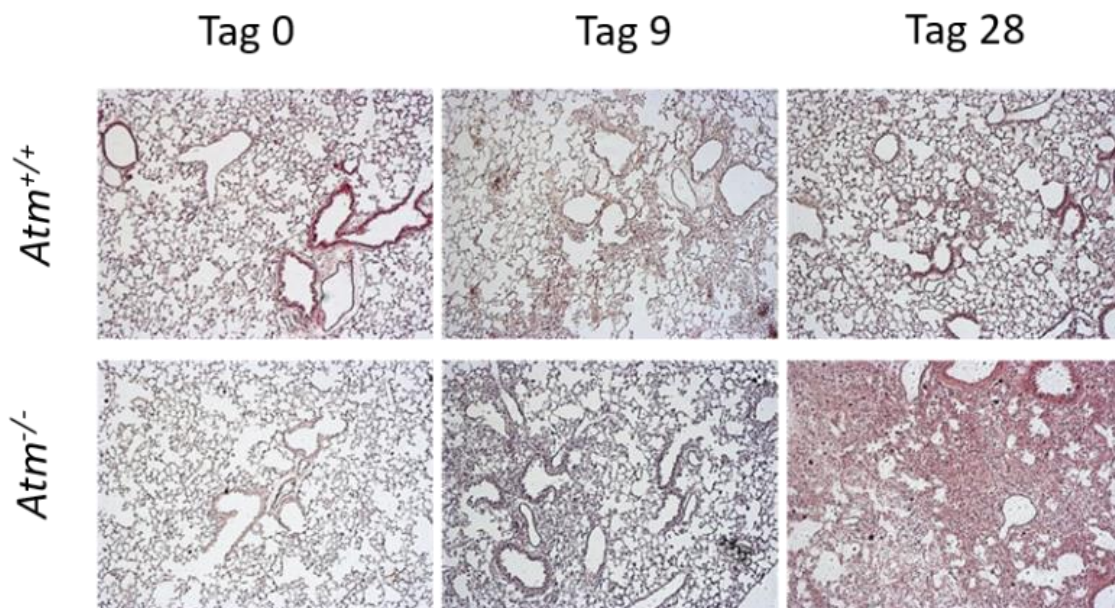


Abbildung 15. Repräsentative histologische Lungenschnitte unbehandelter und BLM-behandelter *Atm*-defizienter und Wildtyp-Mäuse an verschiedenen Untersuchungszeitpunkten zur Darstellung der Infiltration inflammatorischer Zellen ins Lungengewebe.

Die Lungen wurden nach vorangegangenen Lungenfunktionstests und BAL mittels 4 % Paraformaldehyd fixiert. Dann wurden 2 μ m starke Schnitte angefertigt und diese mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

3.6 Manifestation fibrosierender Lungenerkrankungen in Bleomycin behandelten *Atm*-defizienten Mäusen

BLM ruft eine Umgestaltung der Lungenstruktur hervor und induziert den Verlust der Lungenfunktion (Sostman et al. 1977). Kurze Zeit nach der Applikation von BLM kommt es zu entzündlichen Reaktionen, gefolgt von einer erhöhten Expression pro-fibrotischer Marker wie TGF- β , Fibronectin und Procollagen-1) (Chaudhary et al. 2006).

Um inflammatorische und fibrotische Vorgänge, hervorgerufen durch die BLM Applikation, in der Lunge untersuchen zu können, wurden histologische Schnitte an den drei Untersuchungszeitpunkten (Tag 0, 9 und 28) angefertigt.

Wie schon in der Arbeit von Pietzner *et al.* gezeigt werden konnte, gibt es kein Unterschied in der Lungenstruktur von *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen *per se* (Pietzner et al. 2013). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, denn die Lungenschnitte *Atm*-defizienter und gesunder Wildtyp-Mäuse wiesen an Tag 0 ein normales, gesundes Lungenparenchym mit intakten Alveolen auf (Abbildung 16 a.). Die Gabe von BLM führte zu einer moderaten Infiltration inflammatorischer Zellen, vornehmlich neutrophiler Granulozyten. Außerdem ließ sich eine anfängliche Zerstörung der pulmonalen Epithelzellen und eine Verdickung der alveolären Septen in

Atm-defizienten Mäusen verglichen zu Wildtyp-Mäusen feststellen. Im weiteren Verlauf kam es zu einer massiven Verdickung des Lungeninterstitiums und verstärkter Zerstörung der Lungenstruktur an Tag 28 nach BLM-Installation in *Atm*-defizienten Mäusen.

Die Masson-Trichrom Färbung der Lungenschnitte verdeutlichte die massiven fibrotischen Veränderungen anhand der bläulich-grün gefärbten Kollagenfasern im Lungengewebe *Atm*-defizienter Mäuse verglichen zur Wildtyp-Kontrolle nach BLM-Gabe.

Auch die standardisierte Quantifizierung der histologischen Lungenschnitte mit Hilfe des von Ashcroft 1988 eingeführten Bewertungssystems, zeigte die progressiven Veränderungen in BLM behandelten *Atm*-defizienten Mäusen (Abbildung 16. b.-d.). Der Ashcroft Score war in *Atm*-defizienten Mäusen verglichen zu den Wildtyp-Mäusen 28 Tage nach BLM Applikation signifikant erhöht (*Atm*^{-/-} 4,63 ±0,90, *Atm*^{+/+} 1,5 ±0,25, $P < 0,05$) (Abbildung 16 d.).

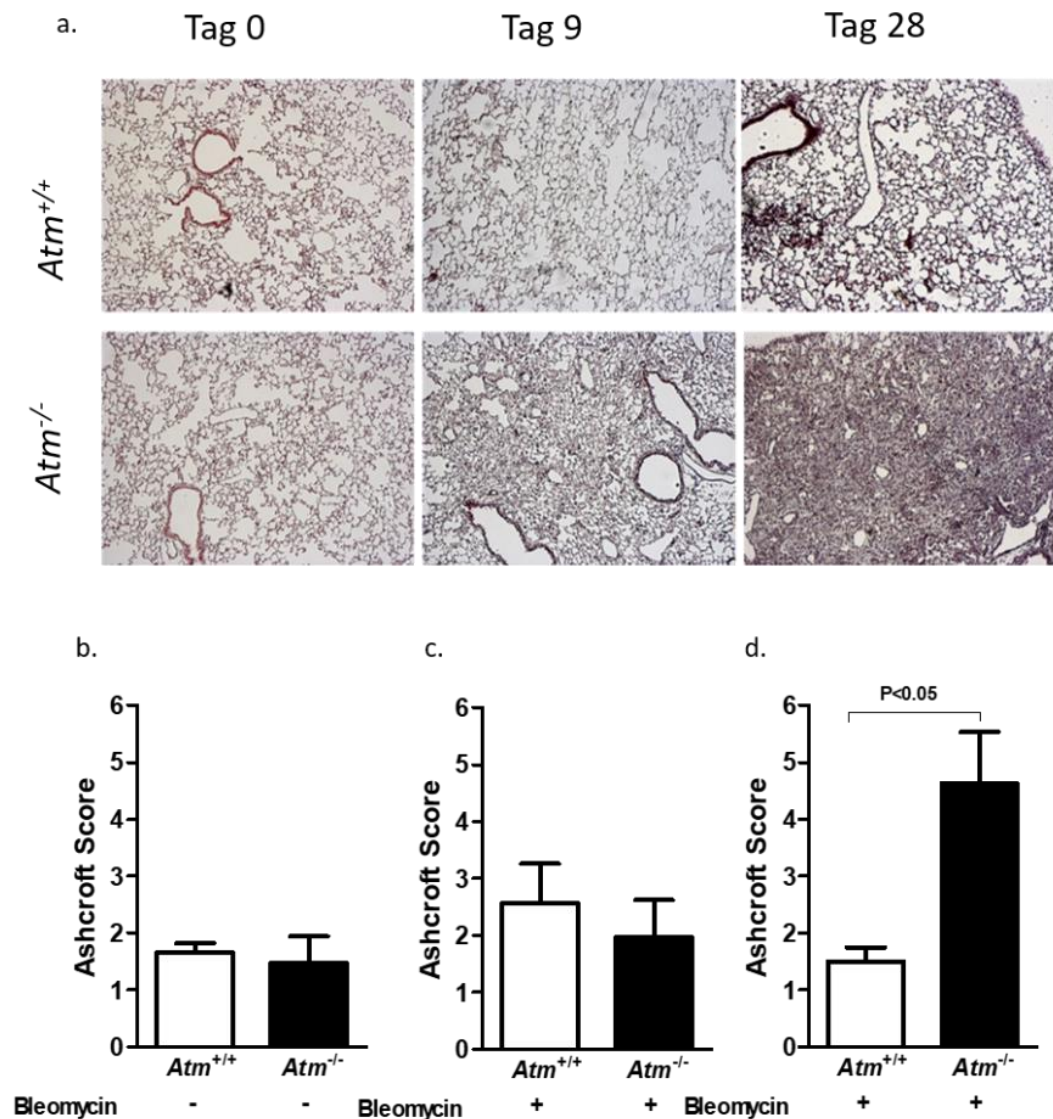


Abbildung 16. Effekt von BLM auf die Kollagen-deposition in der Lunge von *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen.

a.) Repräsentative Darstellung fibrotischer Veränderungen in dem Lungengewebe von *Atm*^{-/-} und *Atm*^{+/+} Mäusen sowohl vor als auch neun und achtundzwanzig Tage nach BLM-Gabe. Die histologischen Lungenschnitte wurden mittels Ashcroft Score von verblindeten, medizinisch ausgebildeten Probanden beurteilt (b.-d.). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ±SEM angegeben.

3.7 Effekt von BLM auf die Lungenfunktionsmessung in *Atm*-defizienten Mäusen

Im Jahr 2014 hat Eickmeier *et al.* als erste die Lungenfunktion in *Atm*-defizienten Mäusen nach einer akuten Lungenschädigung mittels ALI untersucht. Es zeigte sich, dass die *Atm*-defiziente Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus eine signifikant verschlechterte Lungenfunktion aufwies (Eickmeier *et al.* 2014).

Um die Rolle von ATM auf die Lungendynamik nach BLM Induktion zu untersuchen, wurde an allen drei Beobachtungszeitpunkten eine invasive Lungenfunktion mittels mechanischem Ventilator bei den vier Mauskohorten durchgeführt. An Tag 9 und 28 wurde bei den mit BLM bzw. Placebo behandelten Mäusen die Lungenfunktionsmessung durchgeführt. Als Basislinie dienten unbehandelte *Atm*-defiziente und Wildtyp-Mäuse gleichen Alters. Dabei fiel auf, dass unbehandelte *Atm*-defiziente Mäuse einen signifikant erhöhten Atemwiderstand (Rrs, Resistenz) und Atemwegselastizität (Ers, Elastanz) im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Kontrollen (Tag 0, Basislinie) aufwiesen (Abbildung 17). Wie schon von Eickmeier *et al.* im Jahr 2014 beschrieben konnte auch in dieser Studie eine signifikant erniedrigte dynamische Compliance (Crs) in unbehandelten *Atm*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (*Atm*^{-/-} 0,0249 cmH₂O/ml ±0,0015; *Atm*^{+/+} 0,0283 cmH₂O/ml ±0,0016, *P* <0,05) (Abbildung 17 d.) (Eickmeier et al. 2014).

Die Gabe von BLM führte innerhalb von neun Tagen zu einer signifikanten Erniedrigung der Compliance (*Atm*^{-/-} 0,0192 cmH₂O/ml ±0,0075, *P* <0,05; *Atm*^{+/+} 0,0195 cmH₂O/ml ±0,0067, *P* <0,05) (Abbildung 17 e.) bei gleichzeitiger Erhöhung des Atemwegswiderstands (Tag 0: *Atm*^{-/-} 0,909 cmH₂O*s/ml ±0,031; *Atm*^{+/+} 0,638 cmH₂O*s/ml ±0,021, Tag 9: *Atm*^{-/-} 1,073 cmH₂O*s/ml ±0,095; *Atm*^{+/+} 0,922 cmH₂O*s/ml ±0,035, *P* <0,01) und der Atemwegselastizität (Tag 0: *Atm*^{-/-} 39,21 cmH₂O*s/mL ± 0,172; *Atm*^{+/+} 32,68 cmH₂O*s/ml ±0,153, Tag 9: *Atm*^{-/-} 54,56 cmH₂O*s/ml ±0,55; *Atm*^{+/+} 48,54 cmH₂O*s/ml ±0,32, *P* <0,01) sowohl bei *Atm*-defizienten als auch Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den Werten der Basislinie an Tag 0 (Abbildung 17 b. und h.).

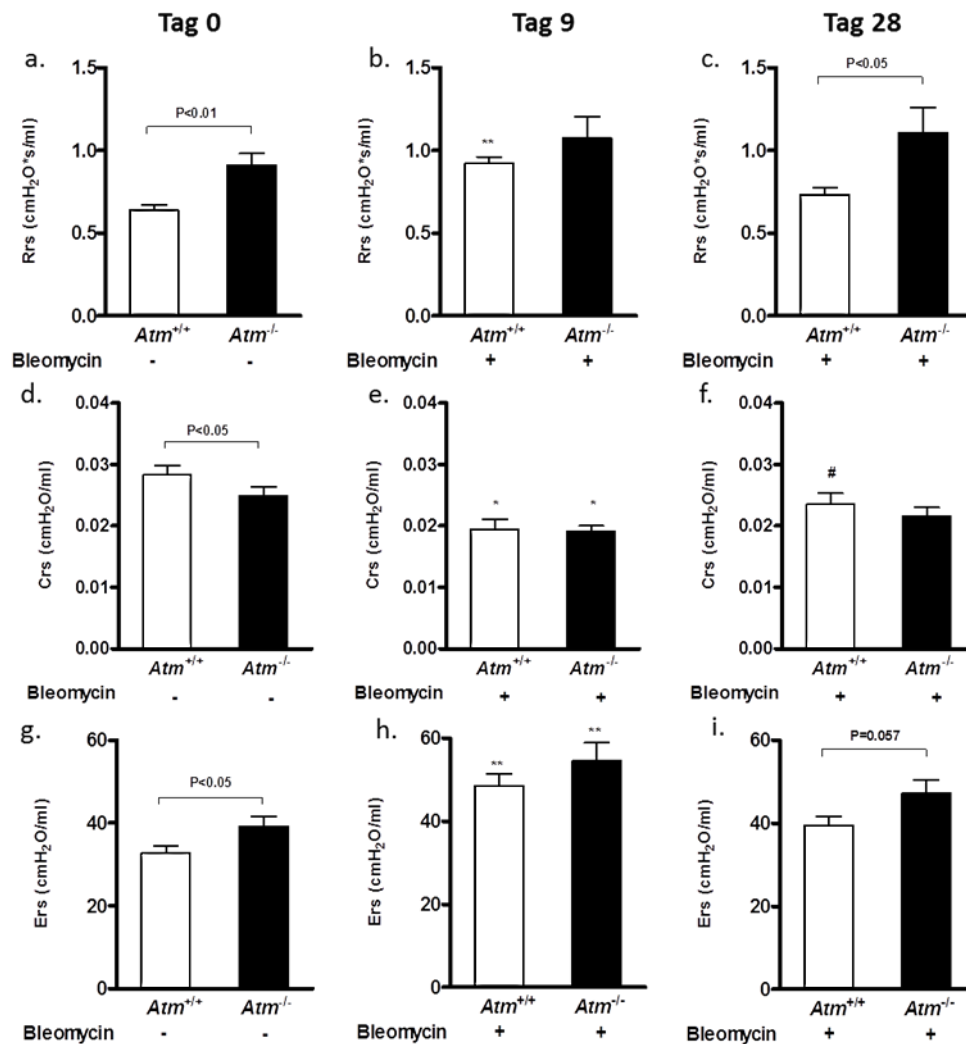


Abbildung 17. Einfluss von BLM auf die Lungenfunktion *Atm*-defizienter Mäuse im Vergleich zum Wildtyp an verschiedenen Beobachtungszeitpunkten.

Die Lungenfunktion wurde bei *Atm*^{-/-} und *Atm*^{+/+} Mäusen vor der Gabe von BLM (links, Tag 0 n = 18), 9 (mitte, Tag 9 n ≥ 6) und 28 Tage (rechts, Tag 28 n ≥ 4) nach BLM-Administration invasiv gemessen. (a.-e.) zeigt den Strömungswiderstand in den Atemwegen (Resistenz), (d.-f.) die Dehnbarkeit des Lungengewebes (Compliance) und (g.-h.) den elastischen Widerstand in der Lunge (Elastanz). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ±SEM angegeben. * *P* <0,05; ** *P* <0,01; # *P* <0,05; * bezogen auf Tag 0 (Baseline); # Unterschiede innerhalb der Genotypen.

Interessanterweise hat sich die Lungenfunktionsmessungen in *Atm*-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp 28 Tage nach BLM Gabe nicht verbessert. Bei den Wildtyp-Mäusen konnte ein signifikanter Anstieg der Compliance von 0,0195 cmH₂O/ml ±0,0067 an Tag 9 auf 0,0236 cmH₂O/ml ±0,0185 (*P* <0,05) an Tag 28 verzeichnet werden (Abbildung 17 f.). Zudem konnte auch eine stärkere Erniedrigung des Atemwegswiderstandes (*Atm*^{-/-} 1,108 cmH₂O*s/ml ±0,137; *Atm*^{+/+} 0,735 cmH₂O*s/ml ±0,088) und der Elastizität (*Atm*^{-/-} 47,239 cmH₂O*s/ml ±0,632; *Atm*^{+/+} 39,579 cmH₂O*s/ml ±0,628) in Wildtyp Mäusen im Vergleich zur Knock-out Maus gemessen

werden (Abbildung 17 c. und i.). Dies deutet auf die verminderte Reparaturkapazität der *Atm*-defizienten Mäuse hinsichtlich irreversibler Lungenschädigung hin.

Bezüglich dieser Methode sei noch erwähnt, dass 50% der *Atm*-defizienten Mäuse an Tag 28 schon in Narkose verstorben waren bevor die Lungenfunktionsmessung begonnen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Dies ist hauptsächlich auf die schlechte körperliche Konstitution der KO-Mäuse zurückzuführen, die durch die Behandlung mit BLM weiterhin vermindert wurde.

3.8 Effekt von BLM auf die Zellviabilität *in vitro*

Um das Ausmaß der BLM-induzierten Schädigung *in vitro* zu untersuchen wurde ein XTT Assay nach 24-stündiger Inkubation mit BLM [100 mU] in A-549 Zellen, eine adhärent wachsende humane alveoläre Typ-2 Zelllinie, durchgeführt.

Die Inkubation mit aufsteigenden BLM Konzentrationen zeigte eine dosisabhängige Verringerung der Zellviabilität in der Lungenkarzinomzelllinie A-549 (A-549 + 0 mU BLM: $2,45 \pm 0,11$, A-549 + 1 mU BLM: $2,17 \pm 0,11$, A-549 + 10 mU BLM: $1,82 \pm 0,12$, A-549 + 100 mU BLM: $1,09 \pm 0,13$, A-549 + 500 mU BLM: $0 \pm 0,00$) (Abbildung 18).

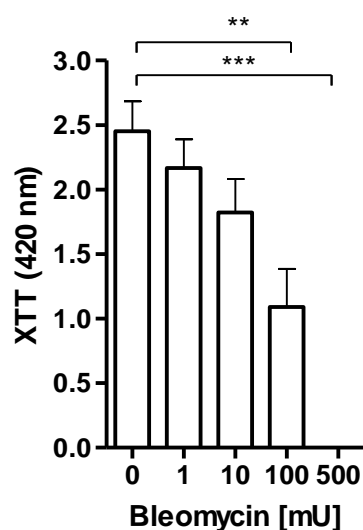


Abbildung 18. Effekt von BLM auf die Viabilität der A-549 Zellen *in vitro*.

A-549 Zellen wurden mit verschiedenen Bleomycinkonzentration [0 mU, 1 mU, 10 mU, 100 mU und 500 mU] für 24 h stimuliert und mittels XTT Assay hinsichtlich ihrer Proliferation getestet. Zu dem Zweck wurden die Lungenzellen mit ansteigenden BLM Konzentrationen für 24 Std. in 96-well Platten stimuliert und die optische Dichte im Photometer bei 420 nm gemessen ($n \geq 7$). Als Positivkontrolle diente 70 % EtOH (hier nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Die zusätzliche Inkubation mit dem ATM-Kinase Inhibitor KU55933 [10 μ M] zeigte in der Lungenkarzinomzelllinie A-549 eine signifikant erniedrigte Zellviabilität im Vergleich zu nichtinhibierten A-549 Zellen (A-549 + 10 μ M KU55933 Verringerung auf $0,86 \pm 0,02$ ausgehend von 1). Außerdem wurde die Zellviabilität durch eine 24-stündige BLM Stimulation in den ATM-Kinase inhibierten Zellen signifikant im Vergleich zu nichtinhibierten A-549 Zellen herabgesetzt (A-549 + 100 mU BLM: Abnahme der Proliferationsrate auf $0,59 \pm 0,13$, A-549 + 10 μ M KU55933 + 100 mU BLM: $0,04 \pm 0,04$) (Abbildung 19).

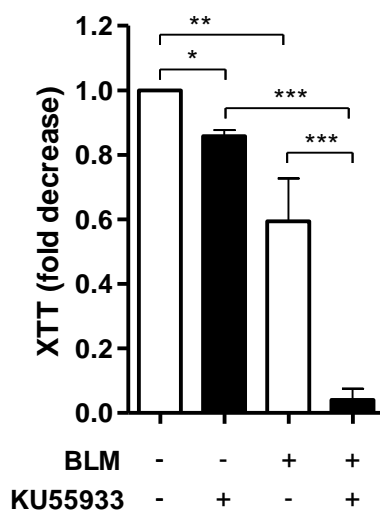


Abbildung 19. Effekt von BLM auf die Viabilität ATM-inhibierter A-549 Zellen *in vitro*.

A-549 Zellen wurden ca. 1 h vor der Bleomycinstimulation mit dem ATM-Inhibitor KU55933 behandelt und anschließend mit 100 mU BLM für 24 h stimuliert. Die Proliferationsrate wurde mittels XTT Assay bestimmt ($n \geq 5$). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Zur Untersuchung des Effekts von BLM auf primäre *Atm*-defiziente Lungenzellen, wurden diese mit aufsteigender Konzentrationen von BLM [1 mU, 10 mU und 100 mU] für 24 Stunden stimuliert. Bei einer Konzentration von 100 mU BLM nahm die Zellviabilität in *Atm*-defizienten Lungenzellen signifikant im Vergleich zu Wildtyp-Lungenzellen ab (*Atm*^{+/+} + 100 mU BLM: $1,29 \pm 1,27$, *Atm*^{-/-} + 100 mU BLM: $0,44 \pm 1,28$) (Abbildung 20).

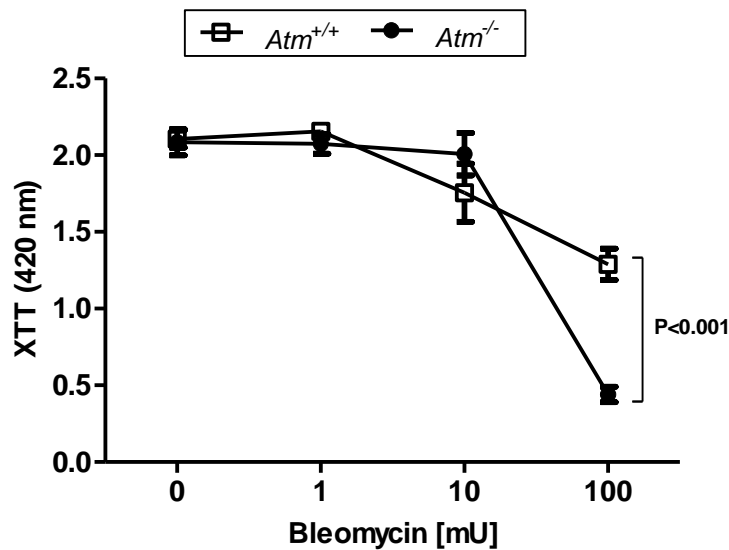


Abbildung 20. Effekt von BLM auf die Viabilität von Lungenzellen isoliert aus *Atm*-defizienten Mäusen *in vitro*.

Die Proliferation der Gesamtlungenzellen isoliert aus *Atm*^{-/-} und *Atm*^{+/+} Mäusen wurde mithilfe des XTT Assay analysiert. Zu dem Zweck wurden die Lungenzellen mit ansteigenden BLM Konzentrationen für 24 h in 96-well Platten stimuliert und die optische Dichte im Photometer bei 420 nm gemessen (n ≥ 7). Als Positivkontrolle diente 70 % EtOH (hier nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ±SEM angegeben. *** *P* < 0,001.

3.9 Effekt von BLM auf intrazelluläre ROS *in vitro*

Die Rolle von ATM in Bezug auf oxidativen Stress wurde in vielen Zellsystemen und Organen bei A-T bereits untersucht (Wu et al. 2017; Yeo et al. 2017; Liu et al. 2005). Jedoch ist die Rolle von ATM in pulmonalen Epithelzellen bis dato weitestgehend ungeklärt. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von BLM in Kombination mit dem ATM-Kinase Inhibitor KU55933 auf die Bildung intrazellulärer Sauerstoffspezies mittels Durchflusszytometrie untersucht.

KU55933 behandelte A-549 Zellen zeigten im Vergleich zu unbehandelten A-549 Zellen ein signifikant erhöhtes DCF Signal. In den zuvor mit KU55933 behandelten und mit BLM stimulierten A-549 Zellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung im DCF Signal im Vergleich zu A-549 Zellen bei denen die ATM-Kinase nicht inhibiert wurde (A-549 + 100 mU BLM + 10 μM KU55933 1,33 ± 0,05, A-549 + BLM 1,18 ± 0,06, A-549 + KU55933 1,15 ± 0,04, *P* < 0,05) (Abbildung 21).

Die Abbildung 21 b.-d. zeigt außerdem repräsentativ eine deutliche Rechtsverschiebung der Histogramme im Overlay nach erfolgter ATM-Kinase Inhibition (a.), BLM Stimulation (b.) und der Kombination aus KU55933 und BLM Inkubation (c.).

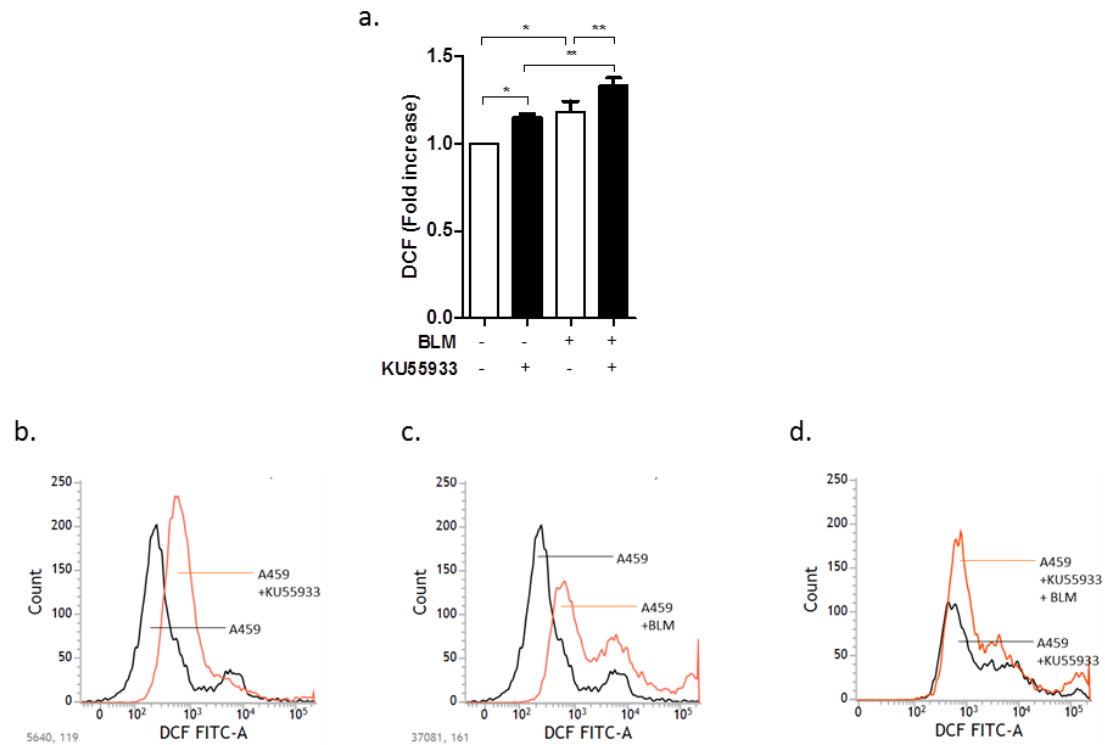


Abbildung 21. Effekt von BLM auf die Bildung von ROS in ATM-inhibierten A-549 Zellen *in vitro*.
 a.) Quantitative Analyse der ROS-Level in ATM-inhibierten und mit 100 mU BLM (über 24 h) stimulierten A-549 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen hinsichtlich der DCF positiven Zellen im Durchflusszytometer ($n \geq 5$). b.-d.) Repräsentative Histogramme der ROS Level in A-549 Zellen nach Inhibierung von ATM (rot), im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (schwarz). (b.) A-549 Zellen stimuliert mit 100 mU BLM über 24 h. (c.) und BLM stimulierte, ATM-Kinase inhibierte A-549 Zellen verglichen zu Wildtyp-Zellen (d.). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Diese Beobachtungen konnten auch für BLM stimulierte primäre Lungenzellen *Atm*-defizienter Mäuse gemacht werden. *Atm*^{-/-} Mäuse zeigten nach 24-stündiger BLM Inkubation einen signifikanten Anstieg an oxidativem Stress, gemessen anhand der intrazellulären DCF Expression (*Fold Increase* in *Atm*^{-/-} $1,08 \pm 0,02$ verglichen zu unbehandelten *Atm*^{-/-}, $P < 0,05$). Die spontane Entwicklung oxidativen Stresses ohne zusätzliche Stimulation durch BLM zeigte keinen signifikanten Unterschied in *Atm*-defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrollkohorte (Abbildung 22).

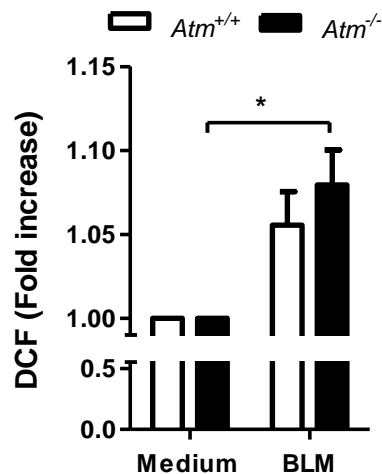


Abbildung 22. Effekt von BLM auf die Bildung oxidativen Stresses in *Atm*-defizienten Mäusen.

Die Gesamtlungenzellen von *Atm*^{-/-} und *Atm*^{+/+} Mäusen wurden für 24 h mit 10 mU BLM stimuliert und anschließend im Durchflusszytometer auf das DCF Signal hin untersucht (n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ±SEM angegeben. * *P* < 0,05.

3.10 Effekt von BLM auf DNA-Schädigungen *in vitro*

Pietzner *et al.* konnte, basierend auf der Analyse des 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin, im Lungengewebe *Atm*-defizienter Mäuse eine signifikante Erhöhung oxidativ bedingter DNA-Schädigung zeigen (Pietzner *et al.* 2016). In dieser Arbeit wurde der Effekt von BLM auf die DNA-Schädigung in Lungenepithelzellen *in vitro* untersucht.

Auf zellulärer Ebene führt BLM zur Bildung freier Radikale, die schließlich zu DNA-Strangbrüchen, Fragmentierungen und Translokation und damit zu Zellschäden führen können. Zum Nachweis der durch BLM induzierten DNA-Schädigungen bzw. DNA-Doppelstrangbrüche wurde eine Einzelzellelektrophorese, Comet Assay genannt, in A-549 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die zuvor ATM-Kinase inhibierten Zellen für 3 h mit 10 mU BLM stimuliert und nicht inhibierten Zellen gegenübergestellt. Wie auch schon umfassend in der Literatur beschrieben führen die BLM induzierten DSB zu Phosphorylierung von γ H2AX (Burma *et al.* 2001; Rube *et al.* 2008). In BLM behandelten A-549 Zellen konnte eine deutliche Ausbildung des Kometen (Schweifes) im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen werden. Es konnten keine Unterschiede zwischen ATM-Kinase inhibierten und nicht inhibierten A-549 Zellen festgestellt werden (Abbildung 23 a.-b.). Diese Aussage wird zudem von der repräsentativen Abbildung 24 gestützt, welche eine vermehrte Anzahl immunfluoreszenzgefärbter γ H2AX Foci nach dreistündiger BLM Stimulation von A-549 Zellen im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen zeigt.

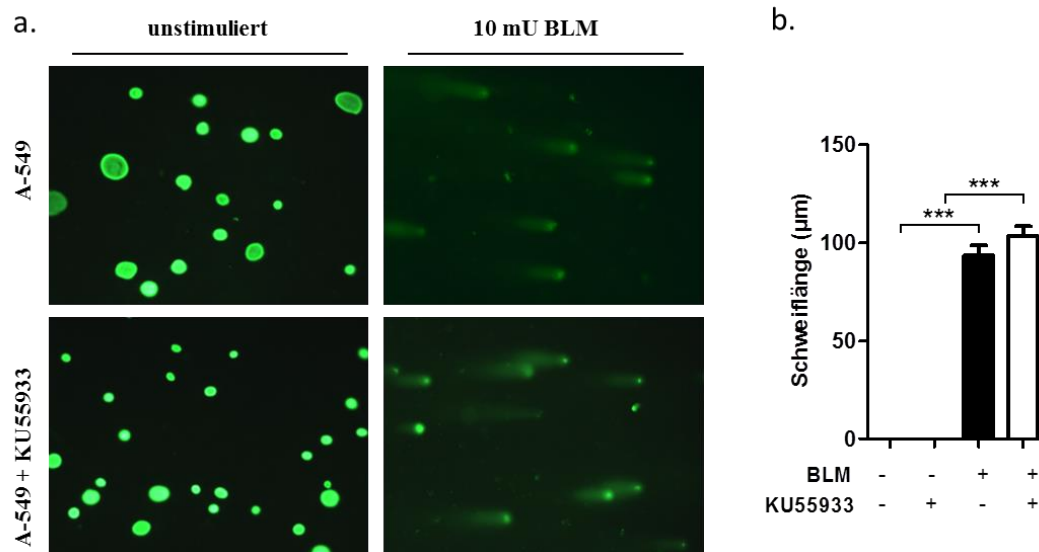


Abbildung 23. BLM-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche in A-549 Zellen mittels neutralem Comet-Assay.

(a.) A-549 Zellen wurden mit oder ohne ATM-Kinase Inhibitor für 3 h mit 10 mU BLM inkubiert und anschließend im FITC Kanal des Fluoreszenzmikroskops analysiert. b.) Quantifizierung der Schweiflänge (Zellkernrand bis Schweifende) in A-549 Zellen mit oder ohne ATM-Kinase Inhibitor vor und nach BLM Stimulation für 3 h. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. *** $P < 0,001$.

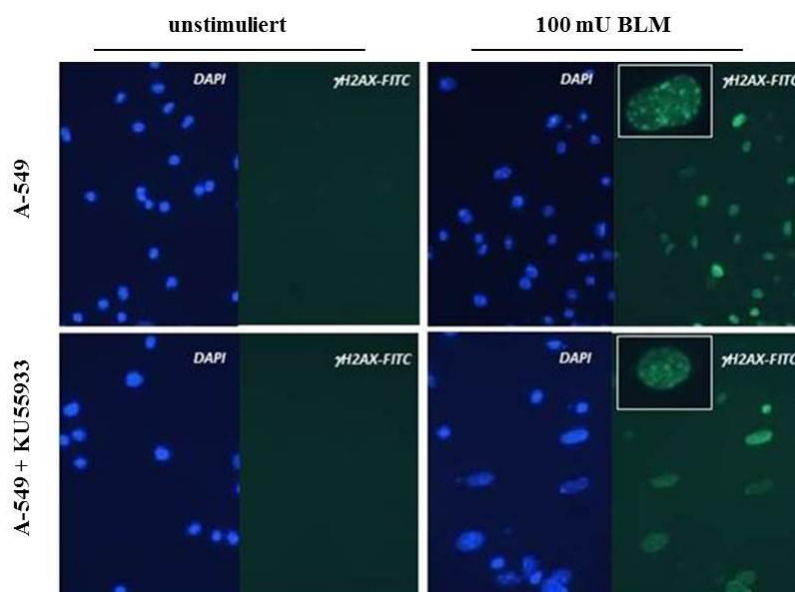


Abbildung 24. Nachweis von DNA-Schädigung in BLM stimulierten A-549 Zellen mittels Immunfluoreszenz.

A-549 Zellen wurden mittels 100 mU BLM für 3 h in Chamber Slides stimuliert und anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung mit anti- γ H2AX.

Zudem konnte im Durchflusszytometer die zeitverzögerte Resolution der γ H2AX Expression in ATM-Kinase inhibierten Zellen der Zelllinie A-549 im Vergleich zu nicht inhibierten Zellen herausgearbeitet werden (Abbildung 25). Vierundzwanzig Stunden nach BLM Behandlung wiesen KU-55933 stimulierte A-549 Zellen ein signifikant erhöhtes γ H2AX Signal im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (*Fold Change* A-549 + 10 μ M KU55933 + 100 mU BLM $87,00 \pm 9,14$, A-549 + 100 mU BLM $59,83 \pm 6,70$).

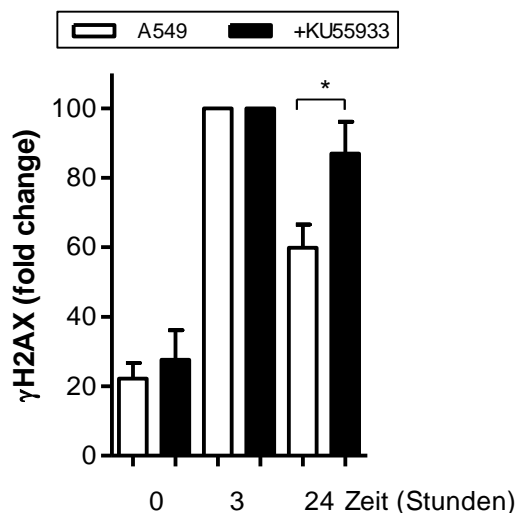


Abbildung 25. Verminderte Reparaturkapazität von Doppelstrangbrüchen in ATM-inhibierten A-549 Zellen nach BLM Stimulation *in vitro*.

A-549 Zellen wurden mit 10 μ M KU55933 eine Stunde vor BLM-Stimulation [100 mU] behandelt, mittels Accutase abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt ($n \geq 5$). Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, blockiert und mittels anti- γ H2AX-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. H_2O_2 diente als Positivkontrolle (hier nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0,05$.

Verfolgt man die Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen weiterhin über Zeit, zeigte sich ein signifikant erhöhtes γ H2AX Signal nach 24-stündiger BLM Stimulation in ATM-Kinase inhibierten A-549 Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen auch noch 72 h nach der BLM Behandlung (24 h: *Fold Change* A-549 + 10 μ M KU55933 + 100 mU BLM $74,00 \pm 1,05$, A-549 + 100 mU BLM $53,38 \pm 1,21$; 72 h: *Fold Change* A-549 + 10 μ M KU55933 + 100 mU BLM $40,75 \pm 1,14$, A-549 + 100 mU BLM $28,41 \pm 1,10$) (Abbildung 26).

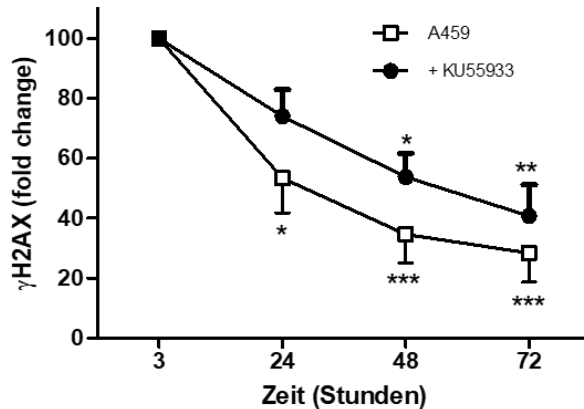


Abbildung 26. Verminderte Reparaturkapazität von Doppelstrangbrüchen in ATM-inhibierten A-549 Zellen nach BLM Stimulation *in vitro* über 72 Stunden.

A-549 Zellen wurden mit 10 μ M KU55933 eine Stunde vor BLM-Stimulation [100 mU] behandelt, mittels Accutase abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt ($n = 4$). Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, blockiert, mittels anti- γ H2AX-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. H_2O_2 diente als Positivkontrolle (hier nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0,05$.

Auch in den Gesamtlungenzellen, die aus *Atm*-defizienten und Wildtyp-Mäusen isoliert wurden, konnte anhand des signifikant erhöhten γ H2AX Signals gezeigt werden, dass die Lungenzellen der *Atm*-defizienten Mäuse 24 Stunden nach BLM Stimulation eine gegenüber dem Wildtyp verminderte DSB-Reparaturkapazität, aufwiesen (*Atm*^{-/-} 27,62 % \pm 0,78, *Atm*^{+/+} 21,28 % \pm 1,51, $P < 0,05$) (Abbildung 27).

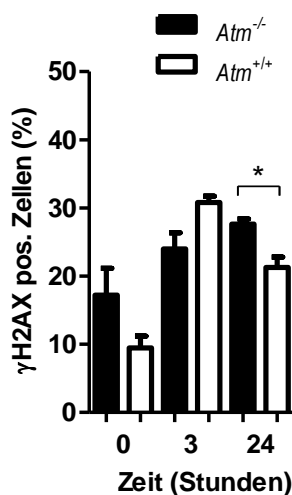


Abbildung 27. Verminderte Reparaturkapazität von DSB nach BLM Induktion in *Atm*-defizienten Mäusen.

Die Gesamtlungenzellen isoliert aus Lungen von *Atm*-defizienten und Wildtyp Mäusen wurden 3 bzw. 24 h mit 10 mU BLM stimuliert, fixiert, permeabilisiert und im Anschluss mittels anti- γ H2AX-Antikörper intrazellulär gefärbt ($n = 5$). Die Analyse der Zellen erfolgte mithilfe des Durchflusszytometers. H_2O_2 diente als Positivkontrolle (hier nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0,05$.

4. Diskussion

Eine der charakteristischen Eigenschaften von A-T sind rezidivierende Atemwegserkrankungen, die zu erheblicher Morbidität und Mortalität bei den Patienten führen. Die Lungenerkrankung entwickelt sich im Laufe der Zeit und viele der Patienten sind im zweiten Lebensjahrzehnt mit Bronchiektasen, chronischen Entzündungen und Lungenfibrosen konfrontiert. Sinopulmonale Infektionen basierend auf der Immundefizienz, Aspiration durch dysfunktionales Schlucken aufgrund neurodegenerativer Progression und Atemmuskelschwäche tragen zur Entwicklung der Lungenerkrankungen bei A-T bei (Bhatt et al. 2015). Weitere in der Literatur beschriebene Faktoren sind eine fehlerhafte Reparatur von Gewebeschädigung, systemische Entzündung und oxidativer Stress (Liu et al. 2005; Wu et al. 2017; Yeo et al. 2017).

Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt und über die Progression lässt sich zurzeit nur spekulieren, aber die Empfindlichkeit gegenüber ROS und ROS-induzierten DNA-Schäden müssen als ein kausaler Faktor für Atemwegserkrankungen bei A-T betrachtet werden. Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die bronchoalveoläre Sensitivität gegenüber ROS und ROS-induzierten DNA-Schäden bei A-T näher zu untersuchen. Die Versuche wurden im *Atm*-defizienten Mausmodell durchgeführt, da die *Atm*-defiziente Maus den humanen Phänotyp gut widerspiegelt. Um eine ROS-induzierte experimentelle pulmonale Entzündung und fibrotische Veränderungen in der Lunge auszulösen wurde das Zytostatikum Bleomycin (BLM) eingesetzt. ROS werden immer öfter in Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener Krankheiten, vor allem Arteriosklerose und Krebs gebracht (Kattoor et al. 2017; Sá Junior et al. 2017). Es gibt verschiedene exogene und endogene Auslöser, die für die Entstehung von ROS verantwortlich sind. Hierbei ist aber auch zu wissen, dass diese reaktiven Formen des Sauerstoffs, ebenso positive Funktionen im Organismus erfüllen. So dienen sie beispielsweise dazu, eindringende Mikroorganismen abzutöten oder als Mediatoren die Synthese von körpereigenen Botenstoffen der Zellen des Immunsystems zu stimulieren (Schieber und Chandel 2014). Ein Übergewicht an ROS kann durch die Umwelt (z.B. Luftschadstoffe, Schwermetalle, Pestizide), durch Genussmittel wie Alkohol oder Tabak, oder die Einnahme diverser Medikamente wie Zytostatika entstehen. Zu den endogenen Auslösern gehören alle Stoffwechselprozesse in unserem Körper, die mit Hilfe von Sauerstoff ablaufen, wie z.B.

die Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Makrophagen und Epithel- und Endothelzellen. Dabei nehmen die Mitochondrien in diesen Zellen eine zentrale Bedeutung in der ROS Produktion ein. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird angenommen, dass etwa 2 % des in den Mitochondrien anfallenden Sauerstoffes in ROS umgewandelt wird (Chance et al. 1979). Weitere Studien weisen darauf hin, dass die ROS-Produktion in den Mitochondrien, die einst als unerwünschtes Nebenprodukt des oxidativen Metabolismus betrachtet wurde, durch Immunsignalwege reguliert und in die Immunantwort eingebaut wird (West et al. 2011; Bulua et al. 2011). Zudem regulieren Mitochondrien und mitochondriale ROS Bestandteile von Signalwegen, die Apoptose (Bender und Martinou 2013), Stammzellendifferenzierung (Maryanovich und Gross 2013), Autophagie (Chen et al. 2009) und Inflammation auf zellulärer Ebene (Mittal et al. 2014). Frühere Studien konnten zeigen, dass Alveolarmakrophagen, die Asbestfasern ausgesetzt waren, in der Lage waren H_2O_2 zu produzieren (Liu et al. 2013). Des Weiteren entstehen ROS auch dann, wenn das antioxidative Abwehrsystem herunterreguliert ist. Dieses System umfasst unter anderem Katalase, Gluthation und Superoxiddismutase (SOD). Durch die intratracheale Verabreichung von Katalase konnte die Ausbildung einer Asbest-induzierten Lungenfibrose in Mäusen verhindert werden (Kliment und Oury 2010). Auch bei anderen chronischen Lungenerkrankungen wurde die Rolle der ROS bei deren Entstehung und Manifestation beschrieben. Bei der COPD sind vier Hauptmechanismen zu nennen: oxidativer Stress, Entzündung, ein Ungleichgewicht von Protease und Anti-Protease und Apoptose (Sturrock et al. 2006). Bei der Pathogenese der COPD spielt oxidativer Stress eine entscheidende Rolle, da er als Auslöser der drei anderen Mechanismen angesehen wird (Białas et al. 2016; Repine et al. 1997).

Oxidantien fördern zudem auch die Entzündung der COPD durch eine Aktivierung von NF- κ B, welches die Expression mehrerer entzündlicher Gene, einschließlich IL-8 und TNF- α , reguliert (Divolis et al. 2016). Auch bei der A-T interagieren oxidativer Stress und chronische pulmonale Entzündung und wirken als synergistische Faktoren.

McGrath-Morrow *et al.*, zeigten bei Patienten mit A-T, dass eine permanent schwelende pulmonale Entzündung im direkten Zusammenhang mit veränderten Lungenfunktionsparametern steht. (McGrath-Morrow et al. 2008; McGrath-Morrow et al. 2016; McGrath-Morrow et al. 2010a).

Im Gegensatz hierzu fanden wir im *Atm*-defizienten Mausmodell keine intrinsische Entzündung in der Lunge, was frühere Daten von Eickmeier *et al.*, die eine leicht eingeschränkte Lungenfunktion bei *Atm*-defizienten Mäusen fanden, ohne Anzeichen

einer fortschreitenden Entzündung, bestätigen (Eickmeier et al. 2014). Dies könnte darin begründet sein, dass die Mäuse in einzeln belüfteten Käfigen gehalten wurden und somit nicht Keimen aus der Umgebung ausgesetzt waren, die eine pulmonale Entzündung hätten auslösen können. Ein weiterer Grund, warum Lungenprobleme selten im *Atm*-defizienten Mausmodell gefunden wurden, könnte darin bestehen, dass die Tiere im Alter von 4-6 Monaten an Tumoren der Thymusdrüse sterben, bevor sich eine Lungenerkrankung manifestieren kann.

Eickmeier *et al.* konnten aber zeigen, dass *Atm*-defiziente Mäuse veränderte Lungenfunktionsparameter und eine beeinträchtigte Immunregulation nach einer säurebedingten Schleimhautschädigung der Atemwege mittels HCl, im Vergleich zur gesunden Kontrollmaus, aufweisen (Eickmeier et al. 2014). Der dieser Studie zugrunde liegende Mechanismus basiert auf der Aspiration einer starken Säure mit der Folge einer Neutrophilen-abhängigen Form der Lungenschädigung, die durch Verletzung der Atemwege und des Alveolarepithels einschließlich der Typ-1-Alveolarepithelzellen gekennzeichnet ist (Knight et al. 1992). Die Studie demonstrierte die höhere pulmonale Sensitivität der *Atm*-defizienten Maus gegenüber endogenen Noxen, hatte aber den Nachteil, dass der Unterschied zwischen schädigenden und nichtschädigenden Säurekonzentrationen sehr gering ist. Des Weiteren aspirieren Patienten keine HCl, sondern komplexe Mageninhalte, bei denen es sich um eine Suspension partikulärer Substanzen, bakteriellen Produkten, Zytokinen und einem pH-Wert über 1,5 handelt (Knight et al. 1992). Dieses Modell erwies sich für uns als ungeeignet, um entzündliche Prozesse in der Lunge, Lungenfunktionsparameter und im Besonderen in dem Zusammenhang die ROS-induzierte DNA-Schädigung im *Atm*-defizienten Mausmodell zu untersuchen.

Die Lungenfibrose ist eine fortschreitende und tödliche Erkrankung, die durch die übermäßige Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM), wie Kollagen I und III, Fibronectin und Lamin im Lungenparenchym und im distalen Alveolarraum gekennzeichnet ist (Hardie et al. 2009). Bei der IPF, die am häufigsten auftritt und die schlechteste Prognose aller idiopathischen interstitiellen Erkrankungen aufweist, tritt die übermäßige Produktion und Ablagerung der EZM in Bereichen auf, in denen sich Apoptose-resistente, aktivierte Fibroblasten angesammelt haben (Hardie et al. 2009). Insbesondere kann die Apoptose von Alveolarepithel-Typ-2 Zellen zum Beispiel bei der Hermansky-Pudlak-Syndrom-assoziierten interstitiellen Pneumonie, sowohl bei

Mäusen, als auch bei Menschen ein bekannter Grund für die Entwicklung von Lungenfibrose darstellen (Mahavadi et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Charakterisierung der primären Lungenzellpopulationen *Atm*-defizienter Mäuse einen erhöhten Prozentsatz an Alveolarepithel-Typ-2 Zellen (AEC2), die von einem erhöhten prozentualen Anteil von Fibroblasten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen begleitet wurden. AEC2 haben neben der Produktion von Surfactant die Aufgabe als Stammzelle der teilungsunfähigen alveolären Typ-1 Zellen, diese im Falle einer Schädigung, zu erneuern. Der von uns gefundene erhöhte Anteil alveolärer Typ-2 Zellen in der *Atm*-defizienten Maus mit einer Proliferation von Fibroblasten und deren Invasion vom Lungeninterstitium in die Alveolarräume, könnte auf ein frühes Stadium des Gewebeumbaus als allgemeines Merkmal der Fibroseprogression hinweisen (Fehrenbach 2001).

In unseren Experimenten fanden wir zudem, eine Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies in den Lungenzellen *Atm*-defizienter Mäuse, insbesondere in der alveolären Typ-2-Population. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend und steht im Einklang mit den Daten von Pietzner *et al.*, die erhöhte Konzentrationen von 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin in der Lunge von *Atm*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen fanden. (Pietzner et al. 2016; Reliene et al. 2004). Zudem stützen sie die Hypothese, dass oxidativer Stress an der Schädigung der Lunge bei Patienten mit A-T beteiligt ist.

Auf der anderen Seite war es überraschend, dass wir in Fibroblasten *Atm*-defizienter Lungen keine Veränderungen in ROS gesehen haben. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die höheren Basalwerte von oxidativem Stress, die wir in der Sca-1⁺ - und CD326⁻ Zellpopulation gefunden haben, das DCF-Signal *Atm*-defizienter Fibroblasten im Durchflusszytometer überdecken.

Eine stetige Konfrontation mit ROS ist ein wichtiger pathogenetischer Faktor bei der Entwicklung verschiedener entzündlicher Erkrankungen, einschließlich chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung, Asthma und Lungenkrebs (Barnes 2016; Rahman et al. 2006; Domej et al. 2014; Holtzman et al. 2014). Darüber hinaus sind endogene und exogene ROS für das Fortschreiten vieler entzündlicher Erkrankungen von zentraler Bedeutung und spielen eine bedeutende Rolle bei der Lungenfibrose (Mittal et al. 2014). Während die Hauptquellen von endogenen ROS, in den Mitochondrien durch oxidative Phosphorylierung erzeugt werden, sind die Hauptquellen für exogene ROS mikrobielle und virale Infektionen oder die Exposition gegenüber Strahlung und toxischen Substanzen (Di Rosanna und Salvatore 2012; Schumacker et al. 2014; Kim et al. 2015).

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass der Verlust der mitochondrialen Integrität in Verbindung mit oxidativem Stress und Schädigung bereits in *Atm*-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte (Schubert et al. 2004).

Ein kürzlich veröffentlichter Bericht zeigte, dass *Streptococcus pneumoniae*, ein Erreger der an sinopulmonalen Infektionen bei A-T-Patienten beteiligt ist, DNA-Doppelstrangbrüche und Apoptose in Epithelzellen durch Sekretion von H₂O₂ verursacht und somit oxidativen Stress hervorruft (Rai et al. 2015). Darüber hinaus konnten Yeo *et al.* die Anfälligkeit der alveoläre Epithelzellen von A-T Patienten gegenüber oxidativen Stress belegen, indem sie zeigen konnten, dass oxidativer Schaden durch wiederkehrende Infektionen durch H₂O₂-produzierende Mikroorganismen zu Lungenerkrankungen bei Patienten mit A-T beiträgt (Yeo et al. 2017).

Basierend auf diesen Beobachtungen und unseren Erkenntnissen könnte geschlossen werden, dass alveoläre Epithelzellen von A-T Patienten besonders empfindlich auf endogene und exogene ROS reagieren und, dass der Lungenerkrankung bei A-T eine Akkumulation von oxidativem Stress und Schädigung zugrunde liegt.

Es ist bekannt, dass die ATM-Inaktivierung mit oxidativem Stress in ATM-defizienten Zellen verbunden ist, aber der genaue Mechanismus dieser Veränderungen ist nicht vollständig verstanden. Darüber hinaus gibt es keine schlüssigen Beweise dafür, dass die ATM-Kinase durch mitochondriale Dysfunktion und die damit einhergehende erhöhte Produktion mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (mROS) aktiviert wird (Lee et al. 2014).

Ambrose *et al.* untersuchten die Hypothese, dass eine mitochondriale Dysfunktion direkt zu erhöhtem oxidativem Stress in A-T-Zellen beitragen kann und ihre Daten zeigten, dass ATM die mitochondriale Homöostase direkt oder indirekt modulieren kann und mit kontinuierlichem oxidativen Stress bei A-T-Patienten assoziiert ist (Ambrose et al. 2007).

Eine chronische, progressive Lungenerkrankung bei A-T-Patienten entwickelt sich im Laufe der Zeit und die Überwachung des Krankheitsverlaufs ist bei diesen Patienten schwierig (McGrath-Morrow et al. 2010b).

Die Hauptgründe hierfür finden sich zum einen in der hohen Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung, deshalb sollten wiederholte Röntgenaufnahmen und CT-Scans vermieden werden (Taylor 2001; Barzilai et al. 2002). Zum anderen sind Magnetresonanztomographie (MRT)-Sequenzen limitierend und die Durchführung einer

validen Spirometrie ist aufgrund neurologischer Schwierigkeiten erschwert (Watters 2003; Lavin 1998). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das BLM-Modell *in vivo* in der *Atm*-defizienten Maus etabliert, um das Fortschreiten entzündlicher und fibrotischer Veränderungen im Lungengewebe gezielt zu verfolgen.

Um die bronchoalveoläre Empfindlichkeit gegenüber ROS und ROS-induzierter DNA-Schädigung in A-T näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit das in der Literatur ausführlich beschriebene Bleomycinmodell etabliert, um experimentelle entzündliche und fibrotische Veränderungen im *Atm*-defizienten Mausmodell zu induzieren (Della Latta et al. 2015).

Die oropharyngeale Gabe von BLM führte zu einem enormen Anstieg der pulmonalen Inflammation in der Anfangsphase und im weiteren Verlauf zu fibrotisch veränderten Lungenstrukturen und einer irreversiblen Verschlechterung der Lungenfunktion in *Atm*-defizienten Mäusen.

BLM ist ein antineoplastisches Antibiotikum, das 1966 aus dem Actinomyceten *Streptomyces verticillus* isoliert wurde (Umezawa 1965). BLM bildet einen Komplex mit Sauerstoff und Metallen wie Fe^{2+} , was zur Bildung von Sauerstoffradikalen, DNA-Brüchen und schließlich zum Zelltod führt (Burger et al. 1981). BLM kann durch das Enzym Bleomycinhydrolase, eine Cysteinprotease, die unterschiedliche Expressionsniveaus in den Lungen zeigt, inaktiviert werden (Sebti et al. 1989; Schwartz et al. 1999). Die Anfälligkeit der Lunge für BLM-induzierte Toxizität hängt weitgehend von den Expressionsniveaus der Bleomycinhydrolase in den Lungen ab. Spezies mit hohen Expressionsniveaus, wie Kaninchen, sind relativ resistent gegen BLM-induzierte Toxizität, wohingegen Spezies mit niedrigen Expressionsniveaus, wie C57BL/6-Mäuse, eine erhöhte Empfindlichkeit zeigen (Lazo und Humphreys 1983). Der Hauptnachteil ist, dass die physiologische Relevanz von BLM oft in Frage gestellt wird, mit dem Argument, dass die intratracheale Instillation von BLM ein "überwältigender Stimulus" ist, der für den klinischen Kontext wenig relevant ist. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die oropharyngeale Applikation als Alternative gewählt, die zum einen nicht-invasiv erfolgte und damit den Stress der Versuchstiere in hohem Maß minimierte und zum anderen gegenüber der intranasalen Gabe von BLM enorme Vorteile, wie die Entwicklung einer prominenteren Lungenfibrose und eine homogenere Ansammlung von Kollagen im Lungengewebe, bietet (Egger et al. 2013).

Das Bleomycinmodell ist jedoch Limitationen unterlegen und kann nicht alle Aspekte der menschlichen Erkrankung repräsentieren. In Kritik steht, dass die Lungenfibrose durch

die exogene Installation von BLM und nicht natürlich hervorgerufen wird. Auch ist die Reversibilität der fibrotischen Veränderungen in der Lunge, die in einigen Tiermodellen nach erfolgter Gabe eines fibrogenen Agens beobachtet wird, ein Phänomen, das bei Menschen nicht auftritt. Der Krankheitsverlauf bei Tieren ist viel vorhersehbarer und der lange Zeitraum (Jahre) der Progression der menschlichen Krankheit ist auf etwa 3 Wochen verkürzt (Moore und Hogaboam 2008). Zudem steht das Bleomycinmodell hinsichtlich der Beurteilung des therapeutischen Potentials antifibrotischer Therapieansätze in der Kritik. Bei der Behandlung der Erkrankung des Menschen hat bisher jedoch keine klinische Studie vergleichbare Erfolge (Chaudhary et al. 2006). Im Rahmen unserer Studie erwies sich BLM als idealer Stimulus um ROS-induzierte DNA-Schädigung im Mausmodell hervorzurufen, und die ausgelöste Inflammation und Fibrosierung des Lungengewebes in einer Art „Zeitraffer“ in den *Atm*-defizienten Mäusen zu untersuchen.

Die Verabreichung von BLM führte zu einem enormen Anstieg pulmonaler Entzündungen und fibrotischen Veränderungen im Lungengewebe *Atm*-defizienter Mäuse, begleitet von einer signifikanten Verschlechterung der Lungenfunktion. Interessanterweise zeigten Lungenfunktionstests eine irreversible Veränderung des Atemwegswiderstands, der Elastance und der Compliance nach der BLM-Gabe aufgrund der fibrosierenden Gewebeveränderungen und somit einhergehend eine Versteifung der Lungenstruktur. Dies spiegelte sich auch im Gewichtsverlust wider.

Die Daten zeigen Parallelen zu Lungenfunktionsuntersuchungen bei älteren A-T-Patienten auf, die ein gemischtes Muster von obstruktiven und restriktiven Lungenerkrankungen zeigen (Schroeder und Zielen 2014; McGrath-Morrow et al. 2014). Montella *et al.* zeigten frühe strukturelle Veränderungen, wie Bronchiektasien und Gewebeverdichtung in den Lungen von A-T-Patienten mittels Hochfeld-MRT (Montella et al. 2013). Dies lässt sich übereinstimmend in *Atm*-defizienten Mäusen finden, die eine verringerte Compliance und eine erhöhte Obstruktion aufwiesen. Folgt man dieser Argumentationslinie, könnte eine permanente unterschwellige Entzündung, die mit einer niedrigeren Lungenfunktion assoziiert ist, ein weiterer Hinweis auf Veränderungen in der Lungenhomöostase von A-T-Patienten sein (McGrath-Morrow et al. 2016).

Angesichts der beobachteten erhöhten Entzündung, die zu starken fibrotischen Veränderungen und irreversiblen Gewebeschäden führte, zeigen unsere Ergebnisse eine sehr hohe Sensitivität und einen geringen Schutz der A-T Lungen gegen ROS und ROS-

induzierende DNA-schädigende Mittel. Der Ausdruck ROS bezieht sich auf zelluläre Sauerstoffradikale, einschließlich Superoxid ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal ($\bullet OH$), die als Folge der Exposition gegenüber toxischen Agenzien und als Sauerstoffnebenprodukte erzeugt werden können (Sen und Packer 1996). Als Secondmessenger kann ROS Zellproliferation, Apoptose und Transformation regulieren (Azad et al. 2009). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit ATM eine zentrale Rolle für die Epithelzellintegrität nach BLM-induzierten ROS und ROS-induzierende DNA-Schädigung spielt.

Die BLM-Behandlung von isolierten primären AEC2 aus *Atm*-defizienten Mäusen und der humanen epithelialen Zelllinie A-549 mit dem ATM-Kinase-Inhibitor KU55933 stützt diese Hypothese. Kalifa *et al.* konnten zudem zeigen, dass DNA-Doppelstrangbrüche die ATM-Kinase in Anwesenheit einer mitochondrialen Dysfunktion in menschlichen A-549-Adenokarzinomzellen aktivierten (Kalifa et al. 2014).

Die Inhibierung von ATM in AEC2-Zellen und die Behandlung mit BLM führte zu einer signifikant verringerten Zellviabilität im Vergleich zu ATM-kompetenten Zellen und zu einer Verzögerung in der Resolution der $\gamma H2AX$ -Expression (Allio und Preston 2000). Vor allem aber führte eine ATM-Defizienz zu einer Zunahme der spontanen intrazellulären ROS, die nach der Behandlung mit BLM signifikant erhöht war. Aktuelle Daten zeigen die zytotoxischen und mutagenen Effekte von BLM auf Epithelzellen und bestätigen die Rolle von ATM bei der adäquaten Funktion der DNA-Reparatur als Antwort auf BLM-induzierte DNA-Schäden (Allio und Preston 2000; Elson et al. 1996). Hohe Spiegel von ROS nach Exposition mit BLM wurden auch beim Nijmegen Breakage Syndrom (NBS), einem weiteren genetischen Instabilitätssyndrom, gezeigt (Krenzlin et al. 2012). Darüber hinaus haben Guo *et al.* kürzlich postuliert, dass ROS in Abwesenheit von DNA-Doppelstrangbrüchen eine ATM-Aktivierung induziert (Guo et al. 2010). Diese Erkenntnis ist aufgrund der entscheidenden Rolle von ROS in A-T von großer Bedeutung. Viele Gruppen, einschließlich unserer, haben gezeigt, dass der Verlust von ATM in Verbindung mit erhöhten ROS-Konzentrationen und einer Überempfindlichkeit gegenüber Substanzen, die oxidativen Stress in verschiedenen Zellen und Geweben induzieren, steht (Barlow et al. 1996; Reichenbach et al. 1999; Ito et al. 2007). In dieser Hinsicht ist die Empfindlichkeit gegenüber ROS in Lungenepithelzellen eine logische Konsequenz und unterstützt die Hypothese, dass oxidativer Stress zu Lungenerkrankungen in A-T beitragen kann.

Der zugrundeliegende Mechanismus ist aber bisher nur ansatzweise verstanden. ATM wird nach DNA-Doppelstrangbrüchen durch den Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)-DNA-Reparaturkomplex aktiviert und koordiniert die Reaktion auf den entstandenen DNA-Schaden (Kurz und Lees-Miller 2004). ROS resultieren hauptsächlich in DNA-Basenschäden oder Schäden am Zuckergerüst der DNA, die zur Bildung von Einzelstrangbrüchen (engl. *single strand breaks*, SSB) führen (Woodbine et al. 2011). Guo *et al.* demonstrierten, dass die Oxidation von ATM direkt, in Abwesenheit von DNA-DSBs und dem MRN-Komplex, eine ATM-Aktivierung induziert (Guo et al. 2010). Die oxidierte Form von ATM ist ein über Disulfidbrücken vernetztes Dimer. Die Mutation eines Cysteinrests, der an der Disulfidbrückenbildung beteiligt ist, blockiert spezifisch die Aktivierung von ATM durch den Oxidationsweg und unterstreicht die Beobachtungen, dass ATM ein wichtiger Sensor für reaktive Sauerstoffspezies in menschlichen Zellen ist.

Durch eine gezielte Mutation von zwei Arginin-Resten (R2579 und R2580), am Ende des FAT-Domäne (FRAP/ATM/TRRAP) von ATM zu zwei Alanin-Resten (R2579A und R2580A), konnten Lee *et al.* kürzlich eine Aktivierung von ATM nach DSBs, aber nicht durch oxidativen Stress zeigen. Weiterhin fanden sie, dass eine Aktivierung von ATM über diese beiden unabhängigen Signalwege die mitochondriale Funktion und die Autophagie fördert, wodurch das Überleben der Zelle gesichert wird. Die Aktivierung von ATM über oxidativen Stress führt zusätzlich zu einer Beseitigung toxischer Proteinaggregate. Die Resultate erweitern die Rolle von ATM und legen nahe, dass der Verlust der ATM-Funktion, wie bei der neurodegenerativen Erkrankung, aber auch bei der Lungenschädigung, einen breiteren zellulären Stress verursacht und nicht nur auf einer fehlerhaften Antwort nach DNA-Schädigung zurückzuführen ist (Lee et al. 2018). Unsere Ergebnisse zeigen erstmals die hohe bronchoalveoläre Sensitivität gegenüber ROS- und ROS-induzierten DNA-Schäden im *Atm*-defizienten Mausmodell und unterstützen die Hypothese, dass ATM eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von oxidativem Stress auf die Inflammation und die fibrotischen Veränderungen der Lunge spielt. Hierbei bieten ROS einen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung innovativer Therapieoptionen. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um tiefere Einblicke in den Mechanismus von oxidativem Stress auf die Lungenschädigung bei A-T zu erlangen.

5. Ausblick

Die Atemwegserkrankung verursacht eine signifikante Morbidität bei Patienten mit Ataxia-Teleangiectasia. Oxidativer Stress und anhaltende unterschwellige Entzündung gelten als Schlüsselfaktoren, die zur Pathogenese der Erkrankung beitragen. Die Serin/Threonin-Kinase ATM fungiert als ein kritischer Regulator in der Zelle und reagiert auf verschiedene Formen von Zellstress, einschließlich oxidativem Stress und DNA-Strangbrüchen. Da ATM für eine antioxidative Reaktion entscheidend ist, ist eine ATM-Defizienz mit erhöhtem oxidativem Stress und Schaden verbunden. Durch die zelluläre Redox-Homöostase werden die Apoptosewege streng reguliert. Daher kann erhöhter oxidativer Stress zum Zelltod führen.

Es gibt verschiedene Formen des programmierten Zelltodes, einschließlich Apoptose und Nekroptose. Bei A-T ist bis zum jetzigen Zeitpunkt die Frage, wie unterschiedliche Formen des programmierten Zelltodes zur Pathogenese oder Progression der Lungenerkrankung beitragen, noch ungeklärt. So könnte z.B. die ROS-abhängige Nekroptose in murinen *Atm*-defizienten Lungenfibroblasten und die Signalwege, die zum programmierten Zelltod führen, genauer untersucht werden, um die molekularen Mechanismen der Lungenfunktionsstörung in A-T zu verstehen und neue Ziele für therapeutische Interventionen zu entwickeln.

Als weitere Therapieoption bietet der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) für die Behandlung fibrotischer Lungenerkrankungen großes Potential. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden Therapien basierend auf der Transplantation von MSCs aufgrund ihres Potenzials für die Gewebereparatur und Regeneration bei der Behandlung verschiedener Krankheiten in klinischen Studien getestet (Rafii et al. 2013). Daher könnte die Transplantation von MSCs im BLM-induzierten Lungenschädigungsmodell in *Atm*-defizienten Mäusen helfen, die anti-inflammatorische und anti-oxidative Wirkung zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T. (2001): Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. In: *Genes & development* 15 (17), S. 2177–2196. DOI: 10.1101/gad.914401.
- Adamson, I. Y. (1976): Pulmonary toxicity of bleomycin. In: *Environmental health perspectives* 16, S. 119–126.
- Adamson, I. Y.; Bowden, D. H. (1974): The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. In: *The American journal of pathology* 77 (2), S. 185–197.
- Ahluwalia, Neil; Grasberger, Paula E.; Mugo, Brian M.; Feghali-Bostwick, Carol; Pardo, Annie; Selman, Moisés et al. (2016): Fibrogenic Lung Injury Induces Non-Cell-Autonomous Fibroblast Invasion. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 54 (6), S. 831–842. DOI: 10.1165/rcmb.2015-0040OC.
- Allio, T.; Preston, R. J. (2000): Increased sensitivity to chromatid aberration induction by bleomycin and neocarzinostatin results from alterations in a DNA damage response pathway. In: *Mutation research* 453 (1), S. 5–15.
- Ambrose, Mark; Goldstine, Jimena V.; Gatti, Richard A. (2007): Intrinsic mitochondrial dysfunction in ATM-deficient lymphoblastoid cells. In: *Human molecular genetics* 16 (18), S. 2154–2164. DOI: 10.1093/hmg/ddm166.
- Ashcroft, T.; Simpson, J. M.; Timbrell, V. (1988): Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. In: *Journal of clinical pathology* 41 (4), S. 467–470.
- Aso, Y.; Yoneda, K.; Kikkawa, Y. (1976): Morphologic and biochemical study of pulmonary changes induced by bleomycin in mice. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 35 (6), S. 558–568.
- Azad, Meghan B.; Chen, Yongqiang; Gibson, Spencer B. (2009): Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS). Implications for cancer progression and treatment. In: *Antioxidants & redox signaling* 11 (4), S. 777–790. DOI: 10.1089/ars.2008.2270.
- Bakkenist, Christopher J.; Kastan, Michael B. (2003): DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. In: *Nature* 421 (6922), S. 499–506. DOI: 10.1038/nature01368.

- Barkauskas, Christina E.; Cronce, Michael J.; Rackley, Craig R.; Bowie, Emily J.; Keene, Douglas R.; Stripp, Barry R. et al. (2013): Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. In: *The Journal of clinical investigation* 123 (7), S. 3025–3036. DOI: 10.1172/JCI68782.
- Barlow, C.; Hirotsune, S.; Paylor, R.; Liyanage, M.; Eckhaus, M.; Collins, F. et al. (1996): Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. In: *Cell* 86 (1), S. 159–171.
- Barnes, Peter J. (2016): Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 138 (1), S. 16–27. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.05.011.
- Barzilai, Ari; Rotman, Galit; Shiloh, Yosef (2002): ATM deficiency and oxidative stress. A new dimension of defective response to DNA damage. In: *DNA repair* 1 (1), S. 3–25.
- Bender, Tom; Martinou, Jean-Claude (2013): Where killers meet--permeabilization of the outer mitochondrial membrane during apoptosis. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (1), a011106. DOI: 10.1101/cshperspect.a011106.
- Bhatt, Jayesh M.; Bush, Andrew; van Gerven, Marjo; Nissenkorn, Andreea; Renke, Michael; Yarlett, Lian et al. (2015): ERS statement on the multidisciplinary respiratory management of ataxia telangiectasia. In: *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 24 (138), S. 565–581. DOI: 10.1183/16000617.0066-2015.
- Białas, Adam Jerzy; Sitarek, Przemysław; Miłkowska-Dymanowska, Joanna; Piotrowski, Wojciech Jerzy; Górski, Paweł (2016): The Role of Mitochondria and Oxidative/Antioxidative Imbalance in Pathobiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, S. 7808576. DOI: 10.1155/2016/7808576.
- Boder, E.; Sedgwick, R. P. (1958): Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. In: *Pediatrics* 21 (4), S. 526–554.
- Bott, L.; Lebreton, Jp; Thumerelle, C.; Cuvellier, Jc; Deschildre, A.; Sardet, A. (2007): Lung disease in ataxia-telangiectasia. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 96 (7), S. 1021–1024. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2007.00338.x.

- Bredemeyer, Andrea L.; Sharma, Girdhar G.; Huang, Ching-Yu; Helmink, Beth A.; Walker, Laura M.; Khor, Katrina C. et al. (2006): ATM stabilizes DNA double-strand-break complexes during V(D)J recombination. In: *Nature* 442 (7101), S. 466–470. DOI: 10.1038/nature04866.
- Brown, A. L.; Lee, C. H.; Schwarz, J. K.; Mitiku, N.; Piwnica-Worms, H.; Chung, J. H. (1999): A human Cds1-related kinase that functions downstream of ATM protein in the cellular response to DNA damage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7), S. 3745–3750.
- Browne, Susan E.; Roberts, L. Jackson; Dennerly, Phyllis A.; Doctrow, Susan R.; Beal, M. Flint; Barlow, Carolee; Levine, Rodney L. (2004): Treatment with a catalytic antioxidant corrects the neurobehavioral defect in ataxia-telangiectasia mice. In: *Free radical biology & medicine* 36 (7), S. 938–942. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.003.
- Bulua, Ariel C.; Simon, Anna; Maddipati, Ravikanth; Pelletier, Martin; Park, Heiyoung; Kim, Kye-Young et al. (2011): Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). In: *The Journal of experimental medicine* 208 (3), S. 519–533. DOI: 10.1084/jem.20102049.
- Burger, R. M.; Peisach, J.; Horwitz, S. B. (1981): Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. In: *The Journal of biological chemistry* 256 (22), S. 11636–11644.
- Burma, S.; Chen, B. P.; Murphy, M.; Kurimasa, A.; Chen, D. J. (2001): ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (45), S. 42462–42467. DOI: 10.1074/jbc.C100466200.
- Buscemi, Giacomo; Perego, Paola; Carenini, Nives; Nakanishi, Makoto; Chessa, Luciana; Chen, Junjie et al. (2004): Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. In: *Oncogene* 23 (46), S. 7691–7700. DOI: 10.1038/sj.onc.1207986.
- Canny, G. J.; Roifman, C.; Weitzman, S.; Braudo, M.; Levison, H. (1988): A pulmonary infiltrate in a child with ataxia telangiectasia. In: *Annals of allergy* 61 (6), 422-3, 466-8.

- Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. In: *Physiological reviews* 59 (3), S. 527–605. DOI: 10.1152/physrev.1979.59.3.527.
- Chaudhary, Nveed I.; Schnapp, Andreas; Park, John E. (2006): Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 173 (7), S. 769–776. DOI: 10.1164/rccm.200505-717OC.
- Chen, Philip; Peng, Cheng; Luff, John; Spring, Kevin; Watters, Dianne; Bottle, Steven et al. (2003): Oxidative stress is responsible for deficient survival and dendritogenesis in purkinje neurons from ataxia-telangiectasia mutated mutant mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (36), S. 11453–11460.
- Chen, Y.; Azad, M. B.; Gibson, S. B. (2009): Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. In: *Cell death and differentiation* 16 (7), S. 1040–1052. DOI: 10.1038/cdd.2009.49.
- Chiumello, Davide; Brochard, Laurent; Marini, John J.; Slutsky, Arthur S.; Mancebo, Jordi; Ranieri, V. Marco et al. (2017): Respiratory support in patients with acute respiratory distress syndrome. An expert opinion. In: *Critical care (London, England)* 21 (1), S. 240. DOI: 10.1186/s13054-017-1820-0.
- Claussen, C. A.; Long, E. C. (1999): Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. In: *Chemical reviews* 99 (9), S. 2797–2816.
- Corti, M.; Brody, A. R.; Harrison, J. H. (1996): Isolation and primary culture of murine alveolar type II cells. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 14 (4), S. 309–315. DOI: 10.1165/ajrcmb.14.4.8600933.
- Della Latta, Veronica; Cecchetti, A.; Del Ry, S.; Morales, M. A. (2015): Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. In: *Pharmacological research* 97, S. 122–130. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.04.012.
- Di Rosanna, Paola; Salvatore, Cuzzocrea (2012): Reactive oxygen species, inflammation, and lung diseases. In: *Current pharmaceutical design* 18 (26), S. 3889–3900.

- Divolis, Georgios; Mavroeidi, Panagiota; Mavrofydi, Olga; Papazafiri, Panagiota (2016): Differential effects of calcium on PI3K-Akt and HIF-1 α survival pathways. In: *Cell biology and toxicology* 32 (5), S. 437–449. DOI: 10.1007/s10565-016-9345-x.
- Domej, Wolfgang; Oettl, Karl; Renner, Wilfried (2014): Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. In: *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 9, S. 1207–1224. DOI: 10.2147/COPD.S51226.
- Egger, Christine; Cannet, Catherine; Gérard, Christelle; Jarman, Elizabeth; Jarai, Gabor; Feige, Agnès et al. (2013): Administration of bleomycin via the oropharyngeal aspiration route leads to sustained lung fibrosis in mice and rats as quantified by UTE-MRI and histology. In: *PloS one* 8 (5), e63432. DOI: 10.1371/journal.pone.0063432.
- Eickmeier, Olaf; Huebner, Marisa; Herrmann, Eva; Zissler, Ulrich; Rosewich, Martin; Baer, Patrick C. et al. (2010): Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. In: *Cytokine* 50 (2), S. 152–157. DOI: 10.1016/j.cyto.2010.02.004.
- Eickmeier, Olaf; Kim, Su Youn; Herrmann, Eva; Döring, Constanze; Duecker, Ruth; Voss, Sandra et al. (2014): Altered mucosal immune response after acute lung injury in a murine model of Ataxia Telangiectasia. In: *BMC pulmonary medicine* 14, S. 93. DOI: 10.1186/1471-2466-14-93.
- Elson, A.; Wang, Y.; Daugherty, C. J.; Morton, C. C.; Zhou, F.; Campos-Torres, J.; Leder, P. (1996): Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (23), S. 13084–13089.
- Fehrenbach, H. (2001): Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. In: *Respiratory research* 2 (1), S. 33–46.
- Fleischman, R. W.; Baker, J. R.; Thompson, G. R.; Schaeppi, U. H.; Illievski, V. R.; Cooney, D. A.; Davis, R. D. (1971): Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs. In: *Thorax* 26 (6), S. 675–682.
- Friedberg, Errol C.; Aguilera, Andres; Gellert, Martin; Hanawalt, Philip C.; Hays, John B.; Lehmann, Alan R. et al. (2006): DNA repair. From molecular mechanism to human disease. In: *DNA repair* 5 (8), S. 986–996.
- Gatti, R. A.; Becker-Catania, S.; Chun, H. H.; Sun, X.; Mitui, M.; Lai, C. H. et al. (2001): The pathogenesis of ataxia-telangiectasia. Learning from a Rosetta Stone. In:

Clinical reviews in allergy & immunology 20 (1), S. 87–108. DOI: 10.1385/CRIAI:20:1:87.

Giangreco, Adam; Arwert, Esther N.; Rosewell, Ian R.; Snyder, Joshua; Watt, Fiona M.; Stripp, Barry R. (2009): Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (23), S. 9286–9291. DOI: 10.1073/pnas.0900668106.

Giangreco, Adam; Reynolds, Susan D.; Stripp, Barry R. (2002): Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. In: *The American journal of pathology* 161 (1), S. 173–182. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64169-7.

Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. (1973): In vitro cultivation of human tumors. Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. In: *Journal of the National Cancer Institute* 51 (5), S. 1417–1423.

Gueven, Nuri; Luff, John; Peng, Cheng; Hosokawa, Kazuyuki; Bottle, Steven E.; Lavin, Martin F. (2006): Dramatic extension of tumor latency and correction of neurobehavioral phenotype in Atm-mutant mice with a nitroxide antioxidant. In: *Free radical biology & medicine* 41 (6), S. 992–1000. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.018.

Gumy-Pause, F.; Wacker, P.; Sappino, A-P (2004): ATM gene and lymphoid malignancies. In: *Leukemia* 18 (2), S. 238–242. DOI: 10.1038/sj.leu.2403221.

Guo, Zhi; Kozlov, Sergei; Lavin, Martin F.; Person, Maria D.; Paull, Tanya T. (2010): ATM activation by oxidative stress. In: *Science (New York, N.Y.)* 330 (6003), S. 517–521. DOI: 10.1126/science.1192912.

Hardie, William D.; Glasser, Stephan W.; Hagood, James S. (2009): Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. In: *The American journal of pathology* 175 (1), S. 3–16. DOI: 10.2353/ajpath.2009.081170.

Hatipoğlu, Umur (2018): Chronic obstructive pulmonary disease. More than meets the eye. In: *Annals of thoracic medicine* 13 (1), S. 1–6. DOI: 10.4103/atm.ATM_193_17.

Hay, J.; Shahzeidi, S.; Laurent, G. (1991): Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. In: *Archives of toxicology* 65 (2), S. 81–94.

- Henner, K. (1968): A propos de la description par Mme Louis-Bar de l'"Ataxia teleangiectasia". Priorité de la description, par Lad. Syllaba et K. Henner en 1926, du réseau vasculaire conjonctival. In: *Revue neurologique* 118 (1), S. 60–63.
- Holtzman, Michael J.; Byers, Derek E.; Alexander-Brett, Jennifer; Wang, Xinyu (2014): The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease. In: *Nature reviews. Immunology* 14 (10), S. 686–698. DOI: 10.1038/nri3739.
- Hostettler, K. E.; Roth, M.; Burgess, J. K.; Gencay, M. M.; Gambazzi, F.; Black, J. L. et al. (2008): Airway epithelium-derived transforming growth factor-beta is a regulator of fibroblast proliferation in both fibrotic and normal subjects. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38 (8), S. 1309–1317. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2008.03017.x.
- Huaux, François; Noel, Sabrina; Dhooghe, Barbara; Panin, Nadtha; Lo Re, Sandra; Lison, Dominique et al. (2013): Dysregulated proinflammatory and fibrogenic phenotype of fibroblasts in cystic fibrosis. In: *PloS one* 8 (5), e64341. DOI: 10.1371/journal.pone.0064341.
- Ito, Keisuke; Takubo, Keiyo; Arai, Fumio; Satoh, Hitoshi; Matsuoka, Sahoko; Ohmura, Masako et al. (2007): Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (1), S. 103–110.
- Izbicki, G.; Segel, M. J.; Christensen, T. G.; Conner, M. W.; Breuer, R. (2002): Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. In: *International journal of experimental pathology* 83 (3), S. 111–119.
- Jo, Helen E.; Prasad, Jyotika D.; Troy, Lauren K.; Mahar, Annabelle; Bleasel, Jane; Ellis, Samantha J. et al. (2018): Diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis. Thoracic Society of Australia and New Zealand and Lung Foundation Australia position statements summary. In: *The Medical journal of Australia* 208 (2), S. 82–88.
- Kalifa, Lidza; Gewandter, Jennifer S.; Staversky, Rhonda J.; Sia, Elaine A.; Brookes, Paul S.; O'Reilly, Michael A. (2014): DNA double-strand breaks activate ATM independent of mitochondrial dysfunction in A549 cells. In: *Free radical biology & medicine* 75, S. 30–39. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.011.
- Kamsler, A.; Daily, D.; Hochman, A.; Stern, N.; Shiloh, Y.; Rotman, G.; Barzilai, A. (2001): Increased oxidative stress in ataxia telangiectasia evidenced by alterations in

- redox state of brains from Atm-deficient mice. In: *Cancer research* 61 (5), S. 1849–1854.
- Kattoor, A Joe John; Pothineni, Naga Venkata K.; Palagiri, Deepak; Mehta, Jawahar L. (2017): Oxidative Stress in Atherosclerosis. In: *Current atherosclerosis reports* 19 (11), S. 42. DOI: 10.1007/s11883-017-0678-6.
- Katzenstein, A. L.; Myers, J. L. (1998): Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 157 (4 Pt 1), S. 1301–1315. DOI: 10.1164/ajrccm.157.4.9707039.
- Khanna, K. K. (2000): Cancer risk and the ATM gene. A continuing debate. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92 (10), S. 795–802.
- Kim, Jin Hee; Kim, Heon; Lee, Kye Young; Choe, Kang-Hyeon; Ryu, Jeong-Seon; Yoon, Ho Il et al. (2006): Genetic polymorphisms of ataxia telangiectasia mutated affect lung cancer risk. In: *Human molecular genetics* 15 (7), S. 1181–1186. DOI: 10.1093/hmg/ddl033.
- Kim, Seok-Jo; Cheresch, Paul; Jablonski, Renea P.; Williams, David B.; Kamp, David W. (2015): The Role of Mitochondrial DNA in Mediating Alveolar Epithelial Cell Apoptosis and Pulmonary Fibrosis. In: *International journal of molecular sciences* 16 (9), S. 21486–21519. DOI: 10.3390/ijms160921486.
- Kinner, Andrea; Wu, Wenqi; Staudt, Christian; Iliakis, George (2008): Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. In: *Nucleic acids research* 36 (17), S. 5678–5694. DOI: 10.1093/nar/gkn550.
- Kliment, Corrine R.; Oury, Tim D. (2010): Oxidative stress, extracellular matrix targets, and idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Free radical biology & medicine* 49 (5), S. 707–717. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.036.
- Knight, P. R.; Druskovich, G.; Tait, A. R.; Johnson, K. J. (1992): The role of neutrophils, oxidants, and proteases in the pathogenesis of acid pulmonary injury. In: *Anesthesiology* 77 (4), S. 772–778.
- Kozlov, Sergei V.; Graham, Mark E.; Peng, Cheng; Chen, Philip; Robinson, Phillip J.; Lavin, Martin F. (2006): Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. In: *The EMBO journal* 25 (15), S. 3504–3514. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601231.

- Krenzlin, Harald; Demuth, Ilja; Salewsky, Bastian; Wessendorf, Petra; Weidele, Kathrin; Bürkle, Alexander; Digweed, Martin (2012): DNA damage in Nijmegen Breakage Syndrome cells leads to PARP hyperactivation and increased oxidative stress. In: *PLoS genetics* 8 (3), e1002557. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002557.
- Kurz, Ebba U.; Lees-Miller, Susan P. (2004): DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. In: *DNA repair* 3 (8-9), S. 889–900. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.03.029.
- Lavin, M. F. (1998): Radiosensitivity and oxidative signalling in ataxia telangiectasia. An update. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 47 (2), S. 113–123.
- Lavin, M. F.; Shiloh, Y. (1997): The genetic defect in ataxia-telangiectasia. In: *Annual review of immunology* 15, S. 177–202. DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.177.
- Lavin, Martin F.; Gueven, Nuri; Bottle, Stephen; Gatti, Richard A. (2007): Current and potential therapeutic strategies for the treatment of ataxia-telangiectasia. In: *British medical bulletin* 81-82, S. 129–147. DOI: 10.1093/bmb/ldm012.
- Lazo, J. S.; Humphreys, C. J. (1983): Lack of metabolism as the biochemical basis of bleomycin-induced pulmonary toxicity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (10), S. 3064–3068.
- Lazo, J. S.; Sebti, S. M. (1994): Bleomycin. In: *Cancer chemotherapy and biological response modifiers* 15, S. 44–50.
- Lee, Ji-Hoon; Guo, Zhi; Myler, Logan R.; Zheng, Suting; Paull, Tanya T. (2014): Direct activation of ATM by resveratrol under oxidizing conditions. In: *PloS one* 9 (6), e97969. DOI: 10.1371/journal.pone.0097969.
- Lee, Ji-Hoon; Mand, Michael R.; Kao, Chung-Hsuan; Zhou, Yi; Ryu, Seung W.; Richards, Alicia L. et al. (2018): ATM directs DNA damage responses and proteostasis via genetically separable pathways. In: *Science signaling* 11 (512). DOI: 10.1126/scisignal.aan5598.
- Leeman, Kristen T.; Fillmore, Christine M.; Kim, Carla F. (2014): Lung stem and progenitor cells in tissue homeostasis and disease. In: *Current topics in developmental biology* 107, S. 207–233. DOI: 10.1016/B978-0-12-416022-4.00008-1.

- Liu, Gang; Cheresch, Paul; Kamp, David W. (2013): Molecular basis of asbestos-induced lung disease. In: *Annual review of pathology* 8, S. 161–187. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-163942.
- Liu, Na; Stoica, George; Yan, Mingshan; Scofield, Virginia L.; Qiang, Wenan; Lynn, William S.; Wong, Paul K. Y. (2005): ATM deficiency induces oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in astrocytes. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85 (12), S. 1471–1480. DOI: 10.1038/labinvest.3700354.
- Lumsden, Joanne M.; McCarty, Thomas; Petiniot, Lisa K.; Shen, Rhuna; Barlow, Carolee; Wynn, Thomas A. et al. (2004): Immunoglobulin class switch recombination is impaired in Atm-deficient mice. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (9), S. 1111–1121. DOI: 10.1084/jem.20041074.
- MacNee, W. (2001): Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. In: *European journal of pharmacology* 429 (1-3), S. 195–207.
- Mahavadi, Poornima; Korfei, Martina; Henneke, Ingrid; Liebisch, Gerhard; Schmitz, Gerd; Gochuico, Bernadette R. et al. (2010): Epithelial stress and apoptosis underlie Hermansky-Pudlak syndrome-associated interstitial pneumonia. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 182 (2), S. 207–219. DOI: 10.1164/rccm.200909-1414OC.
- Maryanovich, Maria; Gross, Atan (2013): A ROS rheostat for cell fate regulation. In: *Trends in cell biology* 23 (3), S. 129–134. DOI: 10.1016/j.tcb.2012.09.007.
- Matsuoka, Shuhei; Ballif, Bryan A.; Smogorzewska, Agata; McDonald, E. Robert; Hurov, Kristen E.; Luo, Ji et al. (2007): ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. In: *Science (New York, N.Y.)* 316 (5828), S. 1160–1166. DOI: 10.1126/science.1140321.
- McFarlin, D. E.; Strober, W.; Waldmann, T. A. (1972): Ataxia-telangiectasia. In: *Medicine* 51 (4), S. 281–314.
- McGrath-Morrow, Sharon; Lefton-Greif, Maureen; Rosquist, Karen; Crawford, Thomas; Kelly, Amber; Zeitlin, Pamela et al. (2008): Pulmonary function in adolescents with ataxia telangiectasia. In: *Pediatric pulmonology* 43 (1), S. 59–66. DOI: 10.1002/ppul.20738.

- McGrath-Morrow, Sharon A.; Collaco, J. Michael; Crawford, Thomas O.; Carson, Kathryn A.; Lefton-Greif, Maureen A.; Zeitlin, Pamela; Lederman, Howard M. (2010a): Elevated serum IL-8 levels in ataxia telangiectasia. In: *The Journal of pediatrics* 156 (4), 682-4.e1. DOI: 10.1016/j.jpeds.2009.12.007.
- McGrath-Morrow, Sharon A.; Collaco, Joseph M.; Detrick, Barbara; Lederman, Howard M. (2016): Serum Interleukin-6 Levels and Pulmonary Function in Ataxia-Telangiectasia. In: *The Journal of pediatrics* 171, 256-61.e1. DOI: 10.1016/j.jpeds.2016.01.002.
- McGrath-Morrow, Sharon A.; Gower, W. Adam; Rothblum-Oviatt, Cynthia; Brody, Alan S.; Langston, Claire; Fan, Leland L. et al. (2010b): Evaluation and management of pulmonary disease in ataxia-telangiectasia. In: *Pediatric pulmonology* 45 (9), S. 847–859. DOI: 10.1002/ppul.21277.
- McGrath-Morrow, Sharon A.; Lederman, Howard M.; Aherrera, Angela D.; Lefton-Greif, Maureen A.; Crawford, Thomas O.; Ryan, Timothy et al. (2014): Pulmonary function in children and young adults with ataxia telangiectasia. In: *Pediatric pulmonology* 49 (1), S. 84–90. DOI: 10.1002/ppul.22760.
- McKinnon, Peter J. (2004): ATM and ataxia telangiectasia. In: *EMBO reports* 5 (8), S. 772–776. DOI: 10.1038/sj.embor.7400210.
- Micol, Romain; Ben Slama, Lilia; Suarez, Felipe; Le Mignot, Loïc; Beauté, Julien; Mahlaoui, Nizar et al. (2011): Morbidity and mortality from ataxia-telangiectasia are associated with ATM genotype. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 128 (2), 382-9.e1. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.03.052.
- Mittal, Manish; Siddiqui, Mohammad Rizwan; Tran, Khiem; Reddy, Sekhar P.; Malik, Asrar B. (2014): Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. In: *Antioxidants & redox signaling* 20 (7), S. 1126–1167. DOI: 10.1089/ars.2012.5149.
- Moeller, Antje; Ask, Kjetil; Warburton, David; Gauldie, Jack; Kolb, Martin (2008): The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 40 (3), S. 362–382. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.08.011.
- Moffitt, K. L.; Martin, S. L.; Jones, A. M.; Webb, A. K.; Cardwell, C.; Tunney, M. M.; Elborn, J. S. (2014): Inflammatory and immunological biomarkers are not related to

- survival in adults with Cystic Fibrosis. In: *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 13 (1), S. 63–68. DOI: 10.1016/j.jcf.2013.06.002.
- Montella, Silvia; Mollica, Carmine; Finocchi, Andrea; Pession, Andrea; Pietrogrande, Maria Cristina; Trizzino, Antonino et al. (2013): Non invasive assessment of lung disease in ataxia telangiectasia by high-field magnetic resonance imaging. In: *Journal of clinical immunology* 33 (7), S. 1185–1191. DOI: 10.1007/s10875-013-9933-y.
- Moore, Bethany B.; Hogaboam, Cory M. (2008): Murine models of pulmonary fibrosis. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 294 (2), L152-60. DOI: 10.1152/ajplung.00313.2007.
- Nowak-Wegrzyn, Anna; Crawford, Thomas O.; Winkelstein, Jerry A.; Carson, Kathryn A.; Lederman, Howard M. (2004): Immunodeficiency and infections in ataxia-telangiectasia. In: *The Journal of pediatrics* 144 (4), S. 505–511. DOI: 10.1016/j.jpeds.2003.12.046.
- Ostling, O.; Johanson, K. J. (1987): Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. In: *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 52 (5), S. 683–691.
- Oxelius, V. A.; Berkel, A. I.; Hanson, L. A. (1982): IgG2 deficiency in ataxia-telangiectasia. In: *The New England journal of medicine* 306 (9), S. 515–517. DOI: 10.1056/NEJM198203043060905.
- Paula-Barbosa, M. M.; Ruela, C.; Tavares, M. A.; Pontes, C.; Saraiva, A.; Cruz, C. (1983): Cerebellar cortex ultrastructure in ataxia-telangiectasia. In: *Annals of neurology* 13 (3), S. 297–302. DOI: 10.1002/ana.410130312.
- Phan, S. H.; Kunkel, S. L. (1992): Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. In: *Experimental lung research* 18 (1), S. 29–43. DOI: 10.3109/01902149209020649.
- Pietzner, J.; Baer, P. C.; Duecker, R. P.; Merscher, M. B.; Satzger-Prodinger, C.; Bechmann, I. et al. (2013): Bone marrow transplantation improves the outcome of Atm-deficient mice through the migration of ATM-competent cells. In: *Human molecular genetics* 22 (3), S. 493–507. DOI: 10.1093/hmg/dds448.
- Pietzner, J.; Merscher, B. M.; Baer, P. C.; Duecker, R. P.; Eickmeier, O.; Fußbroich, D. et al. (2016): Low-dose irradiation prior to bone marrow transplantation results in ATM

- activation and increased lethality in Atm-deficient mice. In: *Bone marrow transplantation* 51 (4), S. 619. DOI: 10.1038/bmt.2016.22.
- Poli, G.; Parola, M. (1997): Oxidative damage and fibrogenesis. In: *Free radical biology & medicine* 22 (1-2), S. 287–305.
- Popa, Valentin; Colby, Thomas V.; Reich, Stanley B. (2002): Pulmonary interstitial disease in Ig deficiency. In: *Chest* 122 (5), S. 1594–1603.
- Prasse, Antje; Pechkovsky, Dmitri V.; Toews, Galen B.; Jungraithmayr, Wolfgang; Kollert, Florian; Goldmann, Torsten et al. (2006): A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 173 (7), S. 781–792. DOI: 10.1164/rccm.200509-1518OC.
- Rafii, Rokhsara; Juarez, Maya M.; Albertson, Timothy E.; Chan, Andrew L. (2013): A review of current and novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Journal of thoracic disease* 5 (1), S. 48–73. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2012.12.07.
- Rahman, Irfan; Biswas, Saibal K.; Kode, Aruna (2006): Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. In: *European journal of pharmacology* 533 (1-3), S. 222–239. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.12.087.
- Rai, Prashant; Parrish, Marcus; Tay, Ian Jun Jie; Li, Na; Ackerman, Shelley; He, Fang et al. (2015): Streptococcus pneumoniae secretes hydrogen peroxide leading to DNA damage and apoptosis in lung cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (26), E3421-30. DOI: 10.1073/pnas.1424144112.
- Rawlins, Emma L.; Hogan, Brigid L. M. (2006): Epithelial stem cells of the lung. Privileged few or opportunities for many? In: *Development (Cambridge, England)* 133 (13), S. 2455–2465. DOI: 10.1242/dev.02407.
- Reichenbach, J.; Schubert, R.; Schwan, C.; Müller, K.; Böhles, H. J.; Zielen, S. (1999): Anti-oxidative capacity in patients with ataxia telangiectasia. In: *Clinical and experimental immunology* 117 (3), S. 535–539.
- Reichenbach, Janine; Schubert, Ralf; Schindler, Detlef; Müller, Klaus; Böhles, Hansjosef; Zielen, Stefan (2002): Elevated oxidative stress in patients with ataxia telangiectasia. In: *Antioxidants & redox signaling* 4 (3), S. 465–469. DOI: 10.1089/15230860260196254.

- Reliene, Ramune; Fischer, Elvira; Schiestl, Robert H. (2004): Effect of N-acetyl cysteine on oxidative DNA damage and the frequency of DNA deletions in atm-deficient mice. In: *Cancer research* 64 (15), S. 5148–5153. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0442.
- Repine, J. E.; Bast, A.; Lankhorst, I. (1997): Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 156 (2 Pt 1), S. 341–357. DOI: 10.1164/ajrccm.156.2.9611013.
- Rotman, G.; Shiloh, Y. (1997a): Ataxia-telangiectasia. Is ATM a sensor of oxidative damage and stress? In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 19 (10), S. 911–917. DOI: 10.1002/bies.950191011.
- Rotman, G.; Shiloh, Y. (1997b): The ATM gene and protein. Possible roles in genome surveillance, checkpoint controls and cellular defence against oxidative stress. In: *Cancer surveys* 29, S. 285–304.
- Rotman, G.; Shiloh, Y. (1998): ATM. From gene to function. In: *Human molecular genetics* 7 (10), S. 1555–1563.
- Rübe, Claudia E.; Grudzenski, Saskia; Kühne, Martin; Dong, Xiaorong; Rief, Nicole; Löbrich, Markus; Rübe, Christian (2008): DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model. Implications for radiosensitivity testing. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (20), S. 6546–6555. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5147.
- Sá Junior, Paulo Luiz de; Câmara, Diana Aparecida Dias; Porcacchia, Allan Saj; Fonseca, Pâmela Maria Moreira; Jorge, Salomão Doria; Araldi, Rodrigo Pinheiro; Ferreira, Adilson Kleber (2017): The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, S. 2467940. DOI: 10.1155/2017/2467940.
- Sacco, Oliviero; Silvestri, Michela; Sabatini, Federica; Sale, Rosa; Defilippi, Anna-Carla; Rossi, Giovanni A. (2004): Epithelial cells and fibroblasts. Structural repair and remodelling in the airways. In: *Paediatric respiratory reviews* 5 Suppl A, S35-40.

- Sanal, O.; Ersoy, F.; Yel, L.; Tezcan, I.; Metin, A.; Ozyürek, H. et al. (1999): Impaired IgG antibody production to pneumococcal polysaccharides in patients with ataxia-telangiectasia. In: *Journal of clinical immunology* 19 (5), S. 326–334.
- Sandoval, N.; Platzer, M.; Rosenthal, A.; Dörk, T.; Bendix, R.; Skawran, B. et al. (1999): Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. In: *Human molecular genetics* 8 (1), S. 69–79.
- Savitsky, K.; Bar-Shira, A.; Gilad, S.; Rotman, G.; Ziv, Y.; Vanagaite, L. et al. (1995): A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. In: *Science (New York, N.Y.)* 268 (5218), S. 1749–1753.
- Schieber, Michael; Chandel, Navdeep S. (2014): ROS function in redox signaling and oxidative stress. In: *Current biology : CB* 24 (10), R453-62. DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
- Schroeder, Scott A.; Swift, Michael; Sandoval, Claudio; Langston, Claire (2005): Interstitial lung disease in patients with ataxia-telangiectasia. In: *Pediatric pulmonology* 39 (6), S. 537–543. DOI: 10.1002/ppul.20209.
- Schroeder, Scott A.; Zielen, Stefan (2014): Infections of the respiratory system in patients with ataxia-telangiectasia. In: *Pediatric pulmonology* 49 (4), S. 389–399. DOI: 10.1002/ppul.22817.
- Schubert, R.; Reichenbach, J.; Zielen, S. (2002): Deficiencies in CD4+ and CD8+ T cell subsets in ataxia telangiectasia. In: *Clinical and experimental immunology* 129 (1), S. 125–132.
- Schubert, Ralf; Erker, Laura; Barlow, Carolee; Yakushiji, Hiroyuki; Larson, Denise; Russo, Angelo et al. (2004): Cancer chemoprevention by the antioxidant tempol in Atm-deficient mice. In: *Human molecular genetics* 13 (16), S. 1793–1802. DOI: 10.1093/hmg/ddh189.
- Schumacker, Paul T.; Gillespie, Mark N.; Nakahira, Kiichi; Choi, Augustine M. K.; Crouser, Elliott D.; Piantadosi, Claude A.; Bhattacharya, Jahar (2014): Mitochondria in lung biology and pathology. More than just a powerhouse. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 306 (11), L962-74. DOI: 10.1152/ajplung.00073.2014.
- Schwartz, D. R.; Homanics, G. E.; Hoyt, D. G.; Klein, E.; Abernethy, J.; Lazo, J. S. (1999): The neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for epidermal

- integrity and bleomycin resistance. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (8), S. 4680–4685.
- Scudiero, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H. et al. (1988): Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. In: *Cancer research* 48 (17), S. 4827–4833.
- Sebti, S. M.; Mignano, J. E.; Jani, J. P.; Srimatkandada, S.; Lazo, J. S. (1989): Bleomycin hydrolase. Molecular cloning, sequencing, and biochemical studies reveal membership in the cysteine proteinase family. In: *Biochemistry* 28 (16), S. 6544–6548.
- Sedgwick, R. P.; Boder, E. (1960): Progressive ataxia in childhood with particular reference to ataxia-telangiectasia. In: *Neurology* 10, S. 705–715.
- Sen, C. K.; Packer, L. (1996): Antioxidant and redox regulation of gene transcription. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10 (7), S. 709–720.
- Seyschab, H.; Schindler, D.; Friedl, R.; Barbi, G.; Boltshauser, E.; Fryns, J. P. et al. (1992): Simultaneous measurement, using flow cytometry, of radiosensitivity and defective mitogen response in ataxia telangiectasia and related syndromes. In: *European journal of pediatrics* 151 (10), S. 756–760.
- Shackelford, R. E.; Innes, C. L.; Sieber, S. O.; Heinloth, A. N.; Leadon, S. A.; Paules, R. S. (2001): The Ataxia telangiectasia gene product is required for oxidative stress-induced G1 and G2 checkpoint function in human fibroblasts. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (24), S. 21951–21959. DOI: 10.1074/jbc.M011303200.
- Shiloh, Yosef (2003): ATM and related protein kinases. Safeguarding genome integrity. In: *Nature reviews. Cancer* 3 (3), S. 155–168. DOI: 10.1038/nrc1011.
- Shiloh, Yosef (2006): The ATM-mediated DNA-damage response. Taking shape. In: *Trends in biochemical sciences* 31 (7), S. 402–410. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.05.004.
- Snider, G. L.; Hayes, J. A.; Korthy, A. L. (1978): Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin. Pathology and stereology. In: *The American review of respiratory disease* 117 (6), S. 1099–1108. DOI: 10.1164/arrd.1978.117.6.1099.

- Sostman, H. D.; Matthay, R. A.; Putman, C. E. (1977): Cytotoxic drug-induced lung disease. In: *The American journal of medicine* 62 (4), S. 608–615.
- Stern, Nora; Hochman, Ayala; Zemach, Naty; Weizman, Nir; Hammel, Ilan; Shiloh, Yosef et al. (2002): Accumulation of DNA damage and reduced levels of nicotine adenine dinucleotide in the brains of Atm-deficient mice. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (1), S. 602–608. DOI: 10.1074/jbc.M106798200.
- Sturrock, Anne; Cahill, Barbara; Norman, Kimberly; Huecksteadt, Thomas P.; Hill, Kenneth; Sanders, Karl et al. (2006): Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 290 (4), L661-L673. DOI: 10.1152/ajplung.00269.2005.
- Su, Bin; Liu, Tiansheng; Fan, Haojun; Chen, Feng; Ding, Hui; Wu, Zhouwei et al. (2016): Inflammatory Markers and the Risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *PloS one* 11 (4), e0150586. DOI: 10.1371/journal.pone.0150586.
- Tanaka, Toshiaki; Halicka, Dorota; Traganos, Frank; Darzynkiewicz, Zbigniew (2009): Cytometric analysis of DNA damage: phosphorylation of histone H2AX as a marker of DNA double-strand breaks (DSBs). In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 523, S. 161–168. DOI: 10.1007/978-1-59745-190-1_11.
- Taylor, A. M. (2001): Chromosome instability syndromes. In: *Best practice & research. Clinical haematology* 14 (3), S. 631–644. DOI: 10.1053/beh.2001.0158.
- Thrall, R. S.; McCormick, J. R.; Jack, R. M.; McReynolds, R. A.; Ward, P. A. (1979): Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. Inhibition by indomethacin. In: *The American journal of pathology* 95 (1), S. 117–130.
- Umezawa, H. (1965): Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 5, S. 1079–1085.
- Umezawa, H.; Suhara, Y.; Takita, T.; Maeda, K. (1966): Purification of bleomycins. In: *The Journal of antibiotics* 19 (5), S. 210–215.
- Verleden, G. M.; Du Bois, R. M.; Bouros, D.; Drent, M.; Millar, A.; Müller-Quernheim, J. et al. (2001): Genetic predisposition and pathogenetic mechanisms of interstitial lung

diseases of unknown origin. In: *The European respiratory journal. Supplement 32*, 17s–29s.

Vooght, Vanessa de; Vanoirbeek, Jeroen A. J.; Haenen, Steven; Verbeken, Erik; Nemery, Benoit; Hoet, Peter H. M. (2009): Oropharyngeal aspiration: an alternative route for challenging in a mouse model of chemical-induced asthma. In: *Toxicology* 259 (1-2), S. 84–89. DOI: 10.1016/j.tox.2009.02.007.

Waldmann, T. A.; McIntire, K. R. (1972): Serum-alpha-fetoprotein levels in patients with ataxia-telangiectasia. In: *Lancet (London, England)* 2 (7787), S. 1112–1115.

Ward, A. J.; Olive, P. L.; Burr, A. H.; Rosin, M. P. (1994): Response of fibroblast cultures from ataxia-telangiectasia patients to reactive oxygen species generated during inflammatory reactions. In: *Environmental and molecular mutagenesis* 24 (2), S. 103–111.

Ward, I. M.; Wu, X.; Chen, J. (2001): Threonine 68 of Chk2 is phosphorylated at sites of DNA strand breaks. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (51), S. 47755–47758. DOI: 10.1074/jbc.C100587200.

Watters, Dianne J. (2003): Oxidative stress in ataxia telangiectasia. In: *Redox report : communications in free radical research* 8 (1), S. 23–29. DOI: 10.1179/135100003125001206.

West, A. Phillip; Shadel, Gerald S.; Ghosh, Sankar (2011): Mitochondria in innate immune responses. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (6), S. 389–402. DOI: 10.1038/nri2975.

Wilson, M. S.; Wynn, T. A. (2009): Pulmonary fibrosis. Pathogenesis, etiology and regulation. In: *Mucosal immunology* 2 (2), S. 103–121. DOI: 10.1038/mi.2008.85.

Woodbine, Lisa; Brunton, H.; Goodarzi, A. A.; Shibata, A.; Jeggo, P. A. (2011): Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair. In: *Nucleic acids research* 39 (16), S. 6986–6997. DOI: 10.1093/nar/gkr331.

Wu, Jianhua; Wang, Fang; Su, Zhiqiang; Liu, Jue; Hu, Sang; Li, Hao et al. (2017): Role of ataxia-telangiectasia mutated in hydrogen peroxide preconditioning against oxidative stress in Neuro-2a cells. In: *Molecular medicine reports* 15 (6), S. 4280–4285. DOI: 10.3892/mmr.2017.6510.

Xu, Y.; Ashley, T.; Brainerd, E. E.; Bronson, R. T.; Meyn, M. S.; Baltimore, D. (1996): Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. In: *Genes & development* 10 (19), S. 2411–2422.

Yalçın, Bilgehan; Kutluk, M. Tezer; Sanal, Ozden; Akyüz, Canan; Anadol, Deniz; Çağlar, Melda et al. (2002): Hodgkin's disease and ataxia telangiectasia with pulmonary cavities. In: *Pediatric pulmonology* 33 (5), S. 399–403.

Yeo, Abrey J.; Fantino, Emmanuelle; Czovek, Dorottya; Wainwright, Claire E.; Sly, Peter D.; Lavin, Martin F. (2017): Loss of ATM in Airway Epithelial Cells Is Associated with Susceptibility to Oxidative Stress. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 196 (3), S. 391–393. DOI: 10.1164/rccm.201611-2210LE.

Yi, M.; Rosin, M. P.; Anderson, C. K. (1990): Response of fibroblast cultures from ataxia-telangiectasia patients to oxidative stress. In: *Cancer letters* 54 (1-2), S. 43–50.

Yount, W. J. (1982): IgG2 deficiency and ataxia-telangiectasia. In: *The New England journal of medicine* 306 (9), S. 541–543. DOI: 10.1056/NEJM198203043060911.

Zielen, S. (1995): Immundefekt-Diagnostik. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 120 (23), S. 857.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Ataxia-Teleangiectasia.	11
Abbildung 2. Die verschiedenen Zelltypen in der Lunge.....	13
Abbildung 3. Verschiedene Phänotypen der Lungenerkrankung bei A-T.	14
Abbildung 4. 10 Jahre (a, b) und 19 Jahre (c, d) alter A-T Patient mit ILD und pulmonaler Fibrose.	16
Abbildung 5. Erkennung von DNA-Schäden und Reparaturmechanismen.	10
Abbildung 6. Analyse der Migration mesenchymaler Stammzellen in der Lunge von <i>Atm</i> -defizienten Mäusen nach Transplantation mittels Bioimaging.....	11
Abbildung 7. Struktur eines Kometen im Comet Assay.	27
Abbildung 8. Verlaufsschema des Dosisfindungsversuches.	29
Abbildung 9. Verlaufsschema des Hauptversuchs.	30
Abbildung 10. Differenziale Leukozytentypisierung der BAL gewonnen aus unbehandelten <i>Atm</i> ^{-/-} und <i>Atm</i> ^{+/+} Mäusen und Sekretion proinflammatorischer Zytokine.....	38
Abbildung 11. Durchflusszytometrische Analyse primärer alveolärer Lungenzellen aus <i>Atm</i> -defizienten (<i>Atm</i> ^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen (<i>Atm</i> ^{+/+}).	39
Abbildung 12. Durchflusszytometrische Analysen reaktiver Sauerstoffspezies in primären alveolären Lungenzellen <i>Atm</i> -defizienter (<i>Atm</i> ^{-/-}) und Wildtyp-Mäuse (<i>Atm</i> ^{+/+}).	41
Abbildung 13. Gewichtsentwicklung nach Gabe von BLM in <i>Atm</i> -defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen im Beobachtungszeitraum von 28 Tagen.	43
Abbildung 14. Differenziale Leukozytentypisierung in der BAL gewonnen aus <i>Atm</i> ^{-/-} und <i>Atm</i> ^{+/+} Mäusen und Sekretion proinflammatorischer Zytokine.	45
Abbildung 15. Repräsentative histologische Lungenschnitte unbehandelter und BLM-behandelter <i>Atm</i> -defizienter und Wildtyp-Mäuse an verschiedenen Untersuchungszeitpunkten zur Darstellung der Infiltration inflammatorischer Zellen ins Lungengewebe.....	46
Abbildung 16. Effekt von BLM auf die Kollagendeposition in der Lunge von <i>Atm</i> -defizienten und Wildtyp-Mäusen.	48

Abbildung 17. Einfluss von BLM auf die Lungenfunktion <i>Atm</i> -defizienter Mäuse im Vergleich zum Wildtyp an verschiedenen Beobachtungszeitpunkten.	50
Abbildung 18. Effekt von BLM auf die Viabilität der A-549 Zellen <i>in vitro</i>	51
Abbildung 19. Effekt von BLM auf die Viabilität ATM-inhibierter A-549 Zellen <i>in vitro</i>	52
Abbildung 20. Effekt von BLM auf die Viabilität von Lungenzellen isoliert aus <i>Atm</i> -defizienten Mäusen <i>in vitro</i>	53
Abbildung 21. Effekt von BLM auf die Bildung von ROS in ATM-inhibierten A-549 Zellen <i>in vitro</i>	54
Abbildung 22. Effekt von BLM auf die Bildung oxidativen Stresses in <i>Atm</i> -defizienten Mäusen.	55
Abbildung 23. BLM-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche in A-549 Zellen mittels neutralem Comet-Assay.	56
Abbildung 24. Nachweis von DNA-Schädigung in BLM stimulierten A-549 Zellen mittels Immunfluoreszenz.	56
Abbildung 25. Verminderte Reparaturkapazität von Doppelstrangbrüchen in ATM-inhibierten A-549 Zellen nach BLM Stimulation <i>in vitro</i>	57
Abbildung 26. Verminderte Reparaturkapazität von Doppelstrangbrüchen in ATM-inhibierten A-549 Zellen nach BLM Stimulation <i>in vitro</i> über 72 Stunden.	58
Abbildung 27. Verminderte Reparaturkapazität von DSB nach BLM Induktion in <i>Atm</i> -defizienten Mäusen.	58

7.2 Publikationen und Tagungsbeiträge

Eigenpublikation

Teile dieser Dissertation wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Duecker R, Baer P, Eickmeier O, Strecker M, Kurz Jennifer, Schaible A, Henrich D, Zielen S, Schubert R (2018). Oxidative stress-induced pulmonary inflammation and fibrosis in a mouse model of human Ataxia Telangiectasia. *Redox Biology*

Weitere Publikationen

Pietzner J, Baer PC, **Duecker RP**, Merscher MB, Satzger-Prodinger C, Bechmann I, Wietelmann A, Del Turco D, Doering C, Kuci S, Bader P, Schirmer S, Zielen S, Schubert R (2013). Bone marrow transplantation improves the outcome of *Atm*-deficient mice through the migration of ATM-competent cells. *Hum Mol Genet*.

Eickmeier O, Kim SY, Herrmann E, Döring C, **Duecker R**, Voss S, Wehner S, Hölscher C, Pietzner J, Zielen S, Schubert R (2014). Altered mucosal immune response after acute lung injury in a murine model of Ataxia Telangiectasia. *BMC Pulm Med*.

Rosewich M, Zissler UM, Kheiri T, Voss S, Eickmeier O, Schulze J, Herrmann E, **Dücker RP**, Schubert R, Zielen S (2015). Airway inflammation in children and adolescents with bronchiolitis obliterans. *Cytokine*

Pietzner J, Merscher BM, Baer PC, **Duecker RP**, Eickmeier O, Fußbroich D, Bader P, Del Turco D, Henschler R, Zielen S, Schubert R (2016). Low-dose irradiation prior to bone marrow transplantation results in ATM activation and increased lethality in *Atm*-deficient mice. *Bone Marrow Transplant*

Tagungsbeiträge

Poster A-T Conference November 2014 in Nijmegen, Niederlande, „*Atm*-deficient mice exhibit increased sensitivity to Bleomycin-induced lung injury.“

Vortrag ZKI Science Meeting April 2016, Frankfurt a. M., Deutschland, „Pulmonale Entzündung und Fibrose im Mausmodell zur humanen Erkrankung Ataxia Telangiectasia.“

Poster UCT Science Day September 2016, Frankfurt a. M., Deutschland, „Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in *Atm*-deficient mice.“

Poster UCT Science Day Oktober 2017, Frankfurt a. M., Deutschland, „Hematopoietic stem cell transplantation restores CD44^{low}CD62L^{high} T-cell populations in *Atm*-deficient mice.“

Poster und Kurzvortrag GPP (Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie), März 2018 in Wien, Österreich, „Oxidative stress-driven pulmonary inflammation and fibrosis in a mouse model of human Ataxia-Telangiectasia.“