

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht über das Institut für
Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Regulation der ROS-Produktion in primär afferenten Neuronen der Ratte unter Hypoxie

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Karin Hoffmann

Gießen 2004

Verlag: DVG Service GmbH

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2004

© 2004 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-936815-99-2

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvgn.net
www.dvgn.net

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. W. Kummer

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. M. Kressin

**Regulation der ROS-Produktion in primär
afferenten Neuronen der Ratte unter Hypoxie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Karin Hoffmann
Tierärztin aus Iserlohn

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Kummer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Kressin

Tag der mündlichen Prüfung: 5. April 2004

Die vorliegende Dissertationsschrift widme ich meinen Eltern, die mich während meines Studium unterstützt und mir diese Ausbildung ermöglicht haben. Auf diesem Wege möchte ich Ihnen dafür danken.

Entscheidungen

Ein Mensch, der für den Fall, er müsste,
sich - meint er - nicht zu helfen wüsste,

trifft doch den richtigen Entschluss
aus tapferm Herzen: Denn er muss!

Das Bild der Welt bleibt immer schief,
betrachtet aus dem Konjunktiv.

Eugen Roth

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	4
2.1 <i>Reaktive Sauerstoffspezies</i>	4
2.2 <i>Herkunft der reaktiven Sauerstoffspezies</i>	5
2.2.1 Mitochondriale Atmungskette	5
2.2.2 NADPH-Oxidase	6
2.2.3 Xanthinoxidase	6
2.2.4 ROS aus anderen Quellen	7
2.3 <i>Sauerstoffsensormodelle</i>	7
2.3.1 Die Prolylhydroxylasen-Theorie für das O ₂ -Sensormodell	8
2.3.2 Die Hämprotein-Hypothese für das O ₂ -Sensor-Modell	10
2.3.3 Die Ionenkanalhypothese für das O ₂ -Sensormodell	11
2.3.4 Die NADPH-Oxidasen-Hypothese für das O ₂ -Sensormodell	12
2.3.5 Die mitochondriale ROS-Hypothese für das O ₂ -Sensormodell	15
2.4 <i>Rotenon: Komplex I-Inhibitor und Aktivator der ROS-Produktion</i>	18
2.5 <i>Phorbol-12-myristat-13-acetat: Aktivator der Protein Kinase-C und der ROS-Produktion</i>	19
2.6 <i>Messung intrazellulärer ROS-Bildung durch Fluoreszenzindikatoren</i>	20
3. Material und Methoden	21
3.1 <i>Material</i>	21
3.1.1 Tiere	21
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien	21
3.1.3 Lösungen, Medien und Puffer	22
3.1.4 Geräte	25
3.2 <i>Methoden</i>	26
3.2.1 Messungen an dissoziierten Spinalganglienneuronen	26
3.2.1.1 Präparation	26
3.2.1.2 Dissoziation und Zellkultur	26
3.2.1.3 ROS-Messung mit Fluoreszenzindikatoren	27
3.2.1.3.1 Reagenzien	27

3.2.1.3.2	Kombination der eingesetzten Substanzen	28
3.2.1.3.3	Inkubation der Zellen	29
3.2.1.3.4	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	29
3.2.1.3.5	Messreihenfolge und -vorgang	30
3.2.2	ROS-Messungen an vitalen Spinalganglienschnitten	30
3.2.2.1	Präparation	30
3.2.2.2	Herstellung der Vitalschnitte	30
3.2.2.3	ROS-Messung mit dem Fluoreszenzindikator DCFH-DA	32
3.2.2.3.1	Inkubation der Vitalschnitte mit DCFH-DA	32
3.2.2.3.2	Positivkontrolle zur Messung einer erhöhten intrazellulären ROS-Produktion mit DCFH-DA	33
3.2.2.3.3	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	34
3.2.2.3.4	Messvorgang	34
3.2.2.4	Statistische Auswertung	34
4	Ergebnisse	36
4.1	<i>Dissoziierte Spinalganglienneurone</i>	36
4.2	<i>Vitale Spinalganglienschnitte</i>	34
4.2.1	Mikroskopische Beschreibung des Fluoreszenzbildes bei Normoxie (20 % O ₂)	36
4.2.2	Inkubation der Vitalschnitte mit Rotenon	38
4.2.3	Inkubation der Vitalschnitte mit PMA	40
4.2.4.	Inkubation der Vitalschnitte unter Normoxie und Hypoxie	42
4.2.5	Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsbedingungen untereinander	45
5.	Diskussion	47
5.1	<i>Methodische Aspekte</i>	47
5.1.1	Verwendung neuronaler Zellen	47
5.1.2	Verwendung von Vitalschnitten	48
5.1.3	Detektion der Fluoreszenzindikatoren mittels Laserscanning-Mikroskopie	49
5.1.4	Verwendung von Nitrobluetetrazolium	51
5.2	<i>Regulation der ROS-Produktion in primär afferenten Neuronen</i>	52
5.2.1	PMA	52
5.2.2	Rotenon	53
5.2.3.	Hypoxie	55
5.3	<i>Regulation der ROS-Produktion in Zellen neuronaler und nicht-neuronaler Herkunft unter Hypoxie</i>	56
5.3.1	ROS-Produktion unter Hypoxie in neuronalen Zellen	56

5.3.2	ROS-Produktion unter Hypoxie in nicht-neuronalen Zellen	54
5.3.3	Vergleichende Betrachtung	58
6	Zusammenfassung	61
7	Summary	63
8	Literaturverzeichnis	65
9	Anhang	87
9.1	<i>Eigene Veröffentlichungen zu dem Thema</i>	87
9.2	<i>Danksagung</i>	88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CLSM	Konfokales Laserscanning-Mikroskop
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
Co ²⁺	Cobalt (II) Ionen
CoCl ₂	Kobaltchlorid
DCF	fluoreszierendes 2', 7'- Dichlorofluoreszein
DCFH	nichtfluoreszierendes 2', 7'- Dichlorofluoreszein
DCFH-DA	2', 7'-Dichlorofluoreszein Diazetat
DRG	dorsal root ganglia
EPO	Erythropoetin
Fe ²⁺	Eisen (II) Ionen
Fe-S	Eisen-Schwefel-Cluster
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ R	Dihydrorhodamin 123
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HIF-PH	HIF-Prolylhydroxylase
LSM	Laserscanning-Mikroskop
n	Versuchsanzahl
N ₂	Stickstoff
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NBT	Nitrobluetetrazolium
NGF	nerve growth factor
NO	Stickoxid
O ₂	Sauerstoff
·OH	Hydroxylradikal
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SOD	Superoxiddismutase
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VHL	von Hippel-Lindau-Syndrom

1 Einleitung

Sauerstoff (O₂) ist für alle Säugetierzellen lebensnotwendig. Um sich vor Hypoxie zu schützen, besitzt jede Säugetierzelle die Möglichkeit, Sauerstoff zu messen und auf Hypoxie mit verschiedenen adaptiven Mechanismen zu reagieren (Chandel et al., 1998; Semenza, 1999; Chandel und Schumacker, 2000). Speziell Neurone reagieren besonders sensibel selbst auf sehr kurze Hypoxieperioden.

Obwohl es zahlreiche Erkenntnisse über die zellulären Reaktionen auf Hypoxie gibt, ist noch wenig über den eigentlichen O₂-Sensor der Zelle bekannt (Chandel und Schumacker, 2000). Unterschiedliche O₂-Sensormodelle wurden in der Vergangenheit diskutiert.

Einige Arbeitsgruppen konnten z.B. O₂-sensitive Ionenkanäle nachweisen, welche in verschiedenen Zelltypen identifiziert werden konnten (Franco-Obregon und Lopez-Barneo, 1996; Buckler, 1997; Fearon et al., 1999).

Goldberg et al. (1988) schlugen Hämproteine als O₂-Sensoren der Zelle vor, welche in der Lage sind, Sauerstoff direkt zu binden und eine O₂-abhängige Konformationsänderung durchzuführen. Diese Konformationsänderung soll zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen und beispielsweise die Transkription von Erythropoetin (EPO) stimulieren, einem Hormon, welches für die Stimulation der Erythrozytenproduktion verantwortlich ist. Fandrey et al. (1994) erweiterten diese Hypothese um die Annahme, dass es sich bei dem Hämprotein um ein H₂O₂-produzierendes Protein handelt, das als Bestandteil des O₂-Sensors die EPO-Produktion kontrolliert.

Eine weitere Theorie ist die Prolylhydroxylasentheorie (Ivan et al., 2001; Jaakola et al., 2001, Yu et al., 2001). Unter Normoxie wird die α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) durch eine HIF-Prolylhydroxylase kontinuierlich hydroxyliert, was als Signal für den proteasomalen Abbau dient. Die Prolinhydroxylierung wird durch Hypoxie inhibiert und führt zu einer Anreicherung von HIF. Da molekularer Sauerstoff für die Hydroxylierungsreaktion erforderlich ist, soll die HIF-Prolylhydroxylase als direkter Sauerstoffsensoren fungieren.

HIF aktiviert die Transkription verschiedener Gene, die für Hypoxie-protective Produkte kodieren, wie beispielsweise EPO.

Eine andere Hypothese besagt, dass eine membrangebundene NADPH-Oxidase ähnlich der NADPH-Oxidase der Neutrophilen und Makrophagen als O₂-Sensor in Frage kommt. Diese NADPH-Oxidase soll in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration H₂O₂ produzieren. Das gebildete H₂O₂ dient als second messenger und reguliert die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen und die Expression von bestimmten Genen, wie z. B. EPO (Acker, 1994; Acker und Xue, 1995).

Wieder andere Untersuchungen zeigen, dass auch Mitochondrien als O₂-Sensoren in Frage kommen. Es wurde festgestellt, dass es unter Hypoxie zu einem Anstieg der in den Mitochondrien gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt. Während dabei den Mitochondrien die Funktion des O₂-Sensors zukommt, scheinen ROS in einer Vielzahl von Zelltypen als second messenger zu dienen (Duranteau et al., 1998; Semenza, 1999; Chandel und Schumacker, 2000).

Ursprünglich wurden die ROS als toxisch betrachtet, da sie in der Lage sind, Fette, Proteine und DNA zu denaturieren (Freeman und Crapo, 1982). Neuere Erkenntnisse schlagen die ROS jedoch nicht ausschließlich als Nebenprodukte des Zellstoffwechsels vor, sondern schreiben ihnen eine wichtige Rolle beim Prozess des Sauerstoffmessens und in der Signaltransduktion der Zelle zu (Finkel, 1998; Rhee, 1999; Chandel und Schumacker, 2000).

Um Klarheit über die Funktion von ROS beim Prozess des Sauerstoffmessens zu gewinnen, führten verschiedene Arbeitsgruppen Untersuchungen an unterschiedlichen Zelltypen durch. Dabei konnte festgestellt werden, dass es in Abhängigkeit vom Zelltyp und den experimentellen Bedingungen unter Hypoxie sowohl zu einer Abnahme (Fandrey, 1994; Kroll und Czyzyk-Krzeska, 1998) als auch zu einer Zunahme (Duranteau et al., 1998; Höhler et al., 1999) der intrazellulären ROS-Konzentration kommen kann. Die Mehrheit dieser Studien wurde an Zellen nicht-neuronaler Herkunft durchgeführt, wie z.B. an Hepatomzellen (Hep 3B oder Hep G2) und Kardiomyozyten (Chandel et al., 1998; Duranteau et al., 1998). Studien an neuronalen Zellen wurden bislang nur an PC12-Zellen durchgeführt, einer Zelllinie, die ursprünglich von einem

Nebennierenmarktumor abstammt (Kroll und Czyzyk-Krzeska, 1998; Höhler et al., 1999). Diese Untersuchungen zeigten auch, dass es Unterschiede in der Regulation der ROS-Produktion in den verschiedenen Zelltypen gibt. So führt beispielsweise die Hemmung der mitochondrialen Elektronentransportkette an Komplex I durch Rotenon bei nicht-neuronalen Zellen zu einer Abnahme der ROS-Produktion (Chandel et al., 1998; Duranteau et al., 1998), während Rotenon in PC12-Zellen zu einer Zunahme der intrazellulären ROS-Konzentration führt (Höhler et al., 1999).

Die Situation in intaktem neuronalen Gewebe ist immer noch unbekannt. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit die Regulation der ROS-Produktion in lebendem neuronalen Gewebe unter Hypoxie untersucht werden.

Eine der ersten Reaktionen von neuronalem Gewebe auf Hypoxie ist die verstärkte Ausschüttung von Transmittern (Fleidervish, 2001). Mit der Absicht, den nicht durch Synapsen vermittelten Einfluss von Hypoxie auf die neuronale ROS-Produktion zu analysieren und eine mögliche Überlagerung der Messergebnisse durch ausgeschüttete Transmitter zu vermeiden, wurden die Spinalganglien der Ratte (dorsal root ganglia, DRG) für die Versuche ausgewählt, da in ihnen keine synaptische Umschaltung erfolgt. Mit Hilfe eines Vibratoms wurden aus den DRGs 100 µm dicke Lebenschnitte hergestellt. Im Anschluss wurde die ROS-Bildung in den vitalen Spinalganglienschnitten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gemessen. Dabei fand der Fluoreszenzindikator DCFH-DA (2', 7'-Dichlorofluoreszein Diazetat) Verwendung. Die intrazelluläre ROS-Bildung wurde mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops (CLSM) gemessen. Diese Technik erlaubt eine eindeutige Unterscheidung der Neurone von anderen Zellen (z.B. Satellitenzellen, Schwann'sche Zellen, etc.), sodass speziell die neuronale ROS-Produktion gemessen werden konnte. Als Positivkontrollen für die intrazelluläre ROS-Messung mit DCFH-DA und H₂R (Dihydrorhodamin 123) wurden der Atmungsketteninhibitor Rotenon und der Protein C-Kinasen-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) verwendet. Beide Substanzen erhöhen auf unterschiedlichen Wegen die intrazelluläre ROS-Konzentration in neuronalen Zellen (Höhler et al., 1999; Noh und Koh, 2000).

2 Literaturübersicht

2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind äusserst reaktionsfähige Sauerstoffverbindungen, die als Nebenprodukt des Zellstoffwechsels gebildet werden. Zu den reaktiven Sauerstoffspezies werden die Sauerstoffradikale Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$), Superoxid-Anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) gezählt. Als Sauerstoffradikale bezeichnet man Sauerstoffverbindungen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen. Zu den reaktiven Sauerstoffspezies zählt wegen seiner Reaktionsfreudigkeit zusätzlich Wasserstoffperoxid (H_2O_2), obwohl es sich bei diesem Molekül nicht um ein Radikal handelt (Rodney et al., 2000).

Radikale sind chemisch äußerst aggressiv und reagieren leicht mit Molekülen ihrer Umgebung. Der Organismus schützt sich vor der toxischen Wirkung der Radikale durch verschiedene Mechanismen. $\text{O}_2^{\cdot-}$ wird unter dem Einfluss zweier Isoformen der Superoxiddismutase (SOD) abgebaut, welche im Zytosol hauptsächlich als CuZnSOD und in der Mitochondrienmatrix als MnSOD vorliegt (Slot et al., 1986). Sie reduziert $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 . Die zelleigene Katalase und Glutathionperoxidase reduzieren H_2O_2 zu Wasser. Wenn die zelluläre Produktion von ROS die Kapazität der Schutzmechanismen übersteigt, werden zelleigene Fette, Proteine und DNA geschädigt. Dieser als "oxidativer Stress" bezeichnete Zustand wird für eine Reihe von Erkrankungen verantwortlich gemacht (Thannikal et al., 2000).

ROS sind aber nicht nur toxische Nebenprodukte des Zellstoffwechsels, sondern dienen der Zelle in niedrigen Konzentrationen als second messenger und spielen eine wichtige Rolle im zellulären Signaltransduktionssystem (Finkel, 1998; Rhee, 1999; Ulrich und Babschmid, 2000). Die ROS scheinen als second messenger auch an den adaptiven Mechanismen der Zelle auf Hypoxie beteiligt zu sein und damit eine massgebliche Funktion im O_2 -Sensormechanismus der Zelle zu haben (Chandel und Schumacker, 2000).

2.2 Herkunft der reaktiven Sauerstoffspezies

Die ROS haben eine Vielzahl unterschiedlicher Quellen. Die in Zusammenhang mit dem Sauerstoffsensormechanismus gebrachten Quellen werden im Folgenden aufgeführt.

2.2.1 Mitochondriale Atmungskette

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen als Nebenprodukte des Zellstoffwechsels und werden vor allem in der mitochondrialen Atmungskette gebildet. Der aerobe Energiestoffwechsel ist abhängig von der oxidativen Phosphorylierung, die einen Teil der in den Mitochondrien stattfindenden Atmungskette darstellt. Die mitochondriale Atmungskette besteht aus vier Enzymkomplexen, der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I), der Succinat-Ubiquinon-Reduktase (Komplex II), der Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) und der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV). Bei der oxidativen Phosphorylierung werden Elektronenpaare der energiereichen Moleküle NADH und FADH₂, welche bei der Glykolyse, der Fettsäureoxidation und dem Citratzyklus entstehen, über die Komplexe I, II, III und IV auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die dabei freiwerdende Energie wird zur ATP-Erzeugung verwendet.

Während der Elektronenübertragung an den vier Komplexen kann es durch unvollständige Reduktion von Sauerstoff zur Entstehung von ROS kommen (Thannikal et al. 2000). Die dabei gebildeten ROS sind H₂O₂ und O₂^{•-} (Chance et al., 1979; Papa und Skulachev, 1979). Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigen, dass besonders den Komplexen II und III eine besondere Rolle in Bezug auf den Sauerstoffsensormechanismus zukommt. Turrens et al. zeigten (1985), dass unter Normoxie ROS an Komplex III gebildet werden. Dabei dient Ubisemiquinon, einer von zwei mobilen Elektronencarriern der Atmungskette, als Elektronenquelle. Durch Abgabe von Elektronen reduziert Ubisemiquinon O₂ zu O₂^{•-}. Untersuchungen an einer Hepatomzelllinie (Hep3B) (Chandel et al., 2000), welche mit verschiedenen Hemmstoffen der mitochondrialen Atmungskette behandelt wurde, zeigten, dass es besonders unter Hypoxie zu einem Anstieg der an Komplex III gebildeten ROS kommt. Die Arbeitsgruppe von Paddenberg et al. (2003) konnte dahingegen den Komplex II als Quelle der hypoxisch induzierten ROS-Produktion in glatten Muskelzellen der Lungengefäße nachweisen.

2.2.2 NADPH-Oxidase

Reaktive Sauerstoffspezies werden auch während der als “respiratory burst” bezeichneten Pathogenabwehr phagozytischer Säugetierzellen synthetisiert. Die gebildeten Sauerstoffspezies wirken dabei als direkt toxisches Agens. Die Bildung der ROS wird durch eine aus mehreren Proteinkomponenten bestehende NADPH-Oxidase der neutrophilen Granulozyten katalysiert (Cross und Jones, 1990; Karnovsky 1994). Verschiedene Proteinkomponenten der NADPH-Oxidase wurden zusätzlich nicht nur in den neutrophilen Granulozyten entdeckt, sondern auch in O_2 -sensitiven Zellen (Görlach et al., 1993; Kummer und Acker, 1995, 1997; Youngson et al., 1997). Diese und andere Untersuchungen führten zu der Annahme, dass eine NADPH-Oxidase ähnlich der Oxidase der Phagozyten auch in anderen Zellen vorhanden und für die Bildung von ROS ($O_2^{\cdot -}$ und H_2O_2) verantwortlich ist. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass es verschiedene Subtypen der NADPH-Oxidase in nicht-phagozytierenden Zellen gibt. Diese werden als Mox 1, Mox 2, ThOX 1, ThOX 2 und Renox bezeichnet (Suh et al., 1999; Ullrich und Bachschmidt, 2000; Geiszt et al., 2000). Gp91phox ist eine katalytische Untereinheit der phagozytären NADPH-Oxidase. Suh et al. (1999) konnten eine zur gp91phox homologe Struktur in glatten Muskelzellen, im Kolon, in der Prostata und im Uterus nachweisen. Diese bezeichneten Suh und Mitarbeiter (1999) mit Mox 1. Bisher konnten fünf zur gp91phox-Untereinheit homologe Strukturen auch in nicht-phagozytierenden Zellen entdeckt werden, die nach neuer Terminologie als Nox 1-5 bezeichnet werden, wobei Nox 1 die ursprüngliche Mox 1 bezeichnet. Nox 2 bezeichnet den katalytischen Kern gp91phox der NADPH-Oxidase der Phagozyten (Arnold et al., 2001, Cheng et al., 2001, Lassegue et al., 2001; Takeya et al., 2003).

2.2.3 Xanthinoxidase

Ein weiteres $O_2^{\cdot -}$ -produzierendes Enzym stellt die Xanthinoxidase (XO) dar. Es handelt sich um ein membran-assoziiertes Enzym, das in Endothelzellen und anderen Zellen gefunden wurde (Ullrich und Bachschmidt, 2000). Die während einer Ischämie mit nachfolgender Reoxygenierung gebildeten ROS der XO werden unter anderem für die anschließend auftretenden endothelialen Schäden verantwortlich gemacht (Cross und Jones, 1990; Ullrich und Bachschmidt, 2000).

2.2.4 ROS aus anderen Quellen

ROS können auch bei verschiedenen anderen Prozessen entstehen. So kann z.B. die Autooxidation von Katecholaminen eine Quelle intrazellulärer ROS darstellen (Miller et al., 1996). Auch die zelleigenen Peroxisomen enthalten eine Reihe von Enzymen, die in der Lage sind ROS, besonders in Form von H_2O_2 zu bilden (Tolbert und Essner, 1981). Das im endoplasmatischen Retikulum enthaltene Cytochrom P-450 ist ebenfalls in der Lage ROS zu bilden. Cytochrom P-450 reduziert molekularen Sauerstoff und bildet $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 (Thannikal et al., 2000). Diese und weitere ROS-Quellen wurden aber nicht in Zusammenhang mit dem Sauerstoffsensormechanismus gebracht und sollen deshalb hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt sein.

2.3 Sauerstoffsensormodelle

Sauerstoff ist ein lebensnotwendiges Substrat für alle Säugetiere. Der Säugetierorganismus hat eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um kurzfristig oder auch langfristig auf eine Sauerstoffunterversorgung zu reagieren:

Beispielsweise sezernieren die Zellen von Leber und Niere als Antwort auf eine niedrige O_2 -Spannung Erythropoetin (EPO), ein Hormon, das die Produktion der roten Blutkörperchen stimuliert (Goldberg et al., 1988). Hypoxie regt auch die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in den Parenchymzellen vieler Gewebe an und führt so zu einer gesteigerten Angiogenese (Levy et al. 1995, Chandel und Schumacker, 2000). In der Lunge führt ein niedriger Sauerstoffpartialdruck (z.B. durch eine Ventilationsstörung) zu einer Gefäßkontraktion, wodurch der Blutstrom von nicht-ventilierten zu ventilierten Lungenpartien umgeleitet wird und die O_2 -Beladung des Blutes optimiert wird (sog. Euler-Liljestrand-Reflex).

Die Sauerstoffkonzentration im Blutstrom und in den Atemwegen wird durch spezialisierte chemosensitive Zellen gemessen, wie sie z.B. im Glomus caroticum (einem Organ, welches an der Bifurkation der A. carotis communis lokalisiert ist) und den Neuroepithelkörperchen der Lunge (lokalisiert in der Mukosa der Atemwege) vorkommen (Youngson et al., 1993; Conforti et al., 1999; Donnelly, 1999). Messen diese Zellen eine niedrige Sauerstoffkonzentration, resultieren daraus zentral vermittelte kardiovaskuläre und pulmonale Antworten, z.B. eine Erhöhung der Atemfrequenz.

Diese Schutzmechanismen sichern die Versorgung mit Sauerstoff in den Organen und schützen so vor irreversiblen Zellschäden (Conforti, 1999). Diesen globalen Reaktionen des Organismus auf Hypoxie sind die Reaktionen auf Zellebene gegenüberzustellen:

Jede Zelle des Säugetierorganismus ist in der Lage auf Hypoxie zu reagieren. Über den genauen Messmechanismus, mit dem die Sauerstoffkonzentration auf Zellebene gemessen wird, und die intrazellulären Signaltransduktionswege ist jedoch noch wenig bekannt.

Es werden gemeinsame Mechanismen in der Mehrzahl aller Zellen angenommen, die die Sauerstoffkonzentration messen und die Transkription bestimmter Gene aktivieren, wie z.B. der Gentranskription von EPO oder VEGF. Eine Schlüsselrolle scheint dabei ein Proteinkomplex zu spielen, der als HIF-1 bezeichnet wird (Srinivas et al., 1998).

HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Struktur eine heterodimere Doppelhelix (bHLH = basic-helix-loop-helix) bildet, und welcher durch eine reduzierte Sauerstoffspannung aktiviert wird (Wenger und Gassmann, 1997). Der HIF-1 Komplex besteht aus zwei Untereinheiten: Die HIF-1 β /ARNT-Untereinheit (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) und eine Isoform der α -Untereinheiten (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α). Die HIF-1 α -Untereinheit wird unter normoxischen Bedingungen kontinuierlich synthetisiert und über das Ubiquitin-Proteasom-System wieder abgebaut. Unter Hypoxie reichert sich die HIF-1 α -Untereinheit vermehrt an (Salceda und Caro, 1997; Semenza, 2001). Hypoxie induziert die Stabilisation der HIF-1 α -Untereinheit, was zu einer Aktivierung der Transkription der oben genannten Gene (EPO, VEGF, glykolytische Enzyme) führt (Salceda und Caro, 1997; Srinivas et al, 1998).

Trotz zunehmender Erkenntnisse über die zellulären Reaktionen auf Hypoxie gibt es verschiedene Hypothesen über den genauen Mechanismus, wie Zellen die Änderungen in der Sauerstoffkonzentration detektieren und diese in eine physiologische Antwort (wie z.B. HIF-1 α -Akkumulation, EPO-Produktion) umwandeln. Die wichtigsten derzeit diskutierten O₂-Sensor-Modelle werden im Folgenden aufgelistet:

2.3.1 Die Prolylhydroxylasen-Theorie für das O₂-Sensormodell

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Fragestellung, mit welchem Mechanismus der Abbau der HIF-1 α -Untereinheit unter Hypoxie

verhindert wird. Wichtige Erkenntnisse liefert dabei ein Multiproteinkomplex, der als pVHL bezeichnet wird. Als VHL wird das sogenannte von Hippel-Lindau-Syndrom abgekürzt. Dabei handelt es sich um eine dominant erbliche Erkrankung mit multiplen Angiomen (= Neubildungen von Gefäßen) der Netzhaut, des Kleinhirns und eventuell des Rückenmarkes, sowie Zystenbildung in Pankreas, Nieren und Leber. Ihre Ursache findet die Erkrankung in einer Überproduktion von Hypoxie-induzierten mRNAs, wie z.B. von VEGF (Ivan et al., 2001). Das Produkt des VHL-Tumor-Suppressor-Gens, pVHL, ist eine Komponente eines Multiproteinkomplexes, welcher strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Ubiquitin-Ligase aufweist, einem Enzym, das für die Ubiquitin-abhängige Proteolyse der HIF-1 α -Untereinheit unter Normoxie verantwortlich gemacht wird (Ivan et al., 2001; Jaakola et al., 2001; Yu et al., 2001). Die Arbeitsgruppen von Jaakola et al. (2001) und von Ivan et al. (2001) konnten zeigen, dass eine Interaktion zwischen pVHL und einer spezifischen Domäne der HIF-1 α -Untereinheit existiert. Diese Interaktion wird durch ein Enzym reguliert, das die Hydroxylierung eines Prolinrestes der HIF-1 α -Untereinheit katalysiert. Dieses Enzym wurde von Jaakola et al. (2001) als HIF-Prolylhydroxylase (HIF-PH) bezeichnet. In früheren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass man die Wirkung von Hypoxie auf das HIF-System mit Co²⁺ und Eisenchelatoren nachahmen kann (Goldberg et al., 1988). Die Prolinhydroxylation wird durch Hypoxie, durch Eisenchelatoren und auch durch Co²⁺-Ionen inhibiert. Es wird vermutet, dass die HIF-PH als direkter Sauerstoffsensoren fungiert (Ivan et al., 2001; Jaakola et al., 2001).

Die bei Säugetieren am besten charakterisierten Prolyl-4-hydroxylasen sind die Isoformen α_1 und α_2 , welche für die Hydroxylation von Prolinresten im Kollagen verantwortlich gemacht werden. Diese beiden verwandten Enzyme befinden sich jedoch im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums, während sich die HIF-1 α -Untereinheit im Zytoplasma der Zelle befindet (Kivirikko und Pihlajaniemi, 1998). Die bisher bekannten Prolylhydroxylasen unterscheiden sich in ihrer Struktur von den HIF-Prolylhydroxylasen, von denen inzwischen 4 Isoformen identifiziert wurden (Epstein et al. 2001; Huang et al. 2002; Oehme et al. 2002).

2.3.2 Die Hämprotein-Hypothese für das O₂-Sensor-Modell

Ein Modell dafür, wie Sauerstoff in der Zelle gemessen werden kann, besagt, dass es sich bei dem O₂-Sensor um ein Hämprotein handelt. Das Hämprotein ist dabei in der Lage, Sauerstoff direkt zu binden und eine O₂-abhängige Konformationsänderung durchzuführen. Im oxidierten Zustand, also in Anwesenheit von O₂, ist das Hämprotein inaktiv. Im deoxidierten Zustand, also bei Hypoxie, ist das Hämprotein aktiv und gibt das Signal "Hypoxie" weiter (Semenza, 1999).

Ihren Ursprung findet diese Hypothese in Untersuchungen, die an Bakterien und Hefen durchgeführt wurden. Bei dem Bakterium *Rhizobium meliloti* findet sich ein als O₂-Sensor fungierendes Hämprotein, das als FixL bezeichnet wird. Es handelt sich dabei um eine Hämkinase, welche unter mikroaerophilen Bedingungen in der Lage ist, einen als FixJ bezeichneten Transkriptionsfaktor des Bakteriums zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung von FixJ aktiviert die Transkription der Gene *nifA* und *fixK*. Die Aktivierung der Kinase FixL erfolgt dabei lediglich über eine Spinänderung des zentralen Eisenatoms in der Hämgruppe des Proteins (Poyton, 1999).

Hofer und Mitarbeiter (2001) konnten ein homologes Protein auch bei Säugetierzellen nachweisen. Dieses als PASKIN bezeichnete Protein weist wie das Hämprotein FixL-Protein eine PAS-Domäne auf. Die große Ähnlichkeit und das ubiquitäre Vorkommen von PASKIN lassen schlussfolgern, dass PASKIN im Säugetierorganismus ähnlich wie FixL in *Rhizobium*-Spezies als O₂-Sensor dienen könnte (Hofer et al. 2001).

Einen weiteren Hinweis für die Hämprotein-Hypothese bietet die Beobachtung, dass die Injektion von Kobaltchlorid (CoCl₂) zu einer Produktion von EPO und zur Polyzythämie bei Ratten führt (Goldwasser et al., 1958). EPO wird unter Hypoxie in Leber und Niere synthetisiert und stimuliert die Produktion der roten Blutkörperchen. Eine vermehrte EPO-Produktion nach Stimulation mit CoCl₂ konnte ebenfalls bei einer humanen Hepatomzelllinie (Hep 3B) festgestellt werden. Der gleiche Effekt konnte erzielt werden, wenn die Zellen einem verminderten Sauerstoffpartialdruck unter gleichzeitiger 10%iger Kohlenmonoxid (CO)-Begasung ausgesetzt wurden (Goldberg et al., 1988). CO ist ein physiologisch stabiles Molekül, welches mit Hämgruppen interagieren kann. Goldberg et al. (1988) nahmen an, dass Co²⁺ anstelle von Fe²⁺ in ein Hämprotein eingebaut wird. Das Hämprotein fungiert dabei als O₂-Sensor, der durch den Einbau von Co²⁺ bzw. die Interaktion mit CO in einen deoxygenierten Zustand

gerät und das Signal "Hypoxie" weiterleitet. Mit Co^{2+} kann die Situation unter Hypoxie nach dieser These nachgeahmt werden. Sowohl CO als auch Co^{2+} führen bei diesem Modell zu einer Konformationsänderung des Hämproteins, was zu einer Stimulation der EPO-Produktion führt.

Eine weitere Untersuchung von Srinivas et al. (1998) zeigte jedoch, dass die Inkubation einer Luciferase bildenden Zelllinie (B-1 Zellen) unter hypoxischen Bedingungen mit Kohlenmonoxid nach Inhibition der Hämsynthese nicht zu einem Ausfall der Antwort auf Hypoxie führte. Die B-1 Zellen stammen von der Hepatomzelllinie Hep 3B ab und reagieren auf Hypoxie mit einer vermehrten Luciferasebildung. Die Luciferasebildung konnte weder durch Kobalt, noch durch den Hämsyntheseinhibitor Desferrioaxamin, noch durch Kohlenmonoxidbegasung gehemmt werden. Srinivas et al. schlugen deshalb vor, dass Hämproteine nicht am O_2 -Sensor-Mechanismus beteiligt sind. Chandel und Schumacker (2000) schlussfolgerten aus Srinivas Experimenten, dass diese Untersuchung zwar nicht ausschließt, dass der O_2 -Sensor ein Hämprotein enthält, aber es stellt die Möglichkeit in Frage, mit Co^{2+} die Situation unter Hypoxie nachahmen zu können.

2.3.3 Die Ionenkanalhypothese für das O_2 -Sensormodell

Ionenkanäle können durch unterschiedliche lokale O_2 -Konzentrationen beeinflusst werden. Das legt die Möglichkeit nahe, dass Ionenkanäle in bestimmten Zelltypen als O_2 -Sensoren fungieren. Hypoxie führt in Typ I-Zellen des Glomus caroticum von adulten Kaninchen zu einer Inhibition von Kaliumströmen (Lopez-Barneo et al., 1988). Eine große Vielfalt von O_2 -sensitiven Ionenkanälen konnte auch in verschiedenen anderen Zelltypen identifiziert werden. So entdeckten z.B. Zhu et al. (1996) in PC12-Zellen O_2 -sensitive Kaliumströme, Franco-Obregon und Lopez-Barneo (1996) wiesen O_2 -sensitive Kalziumkanäle in glatten Muskelzellen von Kaninchen nach und Buckler et al. (1997) zeigten einen O_2 -sensitiven Kaliumstrom in Typ 1-Zellen des Glomus caroticum der Ratte.

Obwohl man nachweisen konnte, dass die Ionenströme in verschiedenen Zelltypen durch die Sauerstoffkonzentration zu beeinflussen sind, gibt es nach wie vor noch keine Erkenntnisse darüber, ob es sich bei den Ionenkanälen selbst um den O_2 -Sensor handelt, oder ob die Veränderung der Ionenströme als Reaktion auf einen außerhalb der Ionenkanäle liegenden O_2 -Sensor entsteht. Das Vorliegen eines außerhalb der

Ionenkanäle liegenden O_2 -Sensors wird durch Untersuchungen von Fearon et al. (1999) nahegelegt, welche nachweisen konnten, dass O_2 -sensitive Ionenkanäle durch Oxidations- und Reduktionsmittel beeinflusst werden können. Fearon et al. (1999) zeigten, dass die Kalziumströme in der $\alpha 1c$ Untereinheit von humanen, kardialen Typ L-Kalziumkanälen in einer humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK 293) durch Hypoxie gehemmt werden. Diese Hemmung konnte durch die Oxidationsmittel Thimerasol und p-Chloromercuribenzsulphonsäure vollständig ausgeschaltet werden. Das Reduktionsmittel 1,4-Dithiothreitol antagonisierte die Wirkung der beiden Oxidantien. Die Beeinflussbarkeit von Ionenkanälen durch Oxidations- und Reduktionsmittel und das Ausschalten der Reaktion der Kanäle auf Hypoxie durch ein Oxidationsmittel lässt annehmen, dass der eigentliche O_2 -Sensor nicht innerhalb des Ionenkanals, sondern außerhalb davon liegt. Die Aktivität der Kanäle könnte durch bestimmte Reduktions- oder Oxidationsmittel beeinflusst werden.

Es gibt Hinweise, dass es sich bei der Messung der Sauerstoffkonzentration durch Ionenkanäle um einen membranassoziierten Prozess handelt. Diese Vermutung beruht auf der Tatsache, dass Ionenkanäle, welche durch die Patch clamp-Methode in isolierten Membranabschnitten ohne anhängende Zellen untersucht wurden, immer noch sensibel auf Veränderungen in der O_2 -Konzentration reagierten (Ganfornina und Lopez-Barneo, 1991; Perez-Garcia et al., 1999).

Eine alternative Interpretation dieser Thematik basiert auf einer Hypothese von Rustenbeck et al. (1999). Diese Arbeitsgruppe konnte bei Versuchen an Typ B-Zellen des Pankreas nachweisen, dass bei der Patch-clamp-Methode auch Mitochondrien am isolierten Membranstück haften bleiben können. Die Öffnungswahrscheinlichkeit von ATP-abhängigen Kaliumkanälen konnte durch mitochondriale Hemmstoffe beeinflusst werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Mitochondrien ebenfalls in den O_2 -Sensor-Mechanismus involviert sind und mit den Ionenkanälen eine funktionelle Einheit bilden. Ein ausschließlich membranassoziiertes Prozess des Sauerstoffmessens über Ionenkanäle kann deshalb durch die Patch-clamp-Untersuchungen nicht bewiesen werden.

2.3.4 Die NADPH-Oxidasen-Hypothese für das O_2 -Sensormodell

Bei diesem Modell für den O_2 -Sensormechanismus handelt es sich um eine Erweiterung der Hämprotein-Hypothese. Spektrophotometrische Studien im Glomus caroticum

ergaben ein sauerstoffabhängiges Häm-signal mit Absorptionsmaxima bei 558, 518 und 425 nm. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass ein Hämprotein, welches starke Ähnlichkeit mit dem Cytochrom b_{558} der NADPH-Oxidase der neutrophilen Granulozyten aufweist, auch in Typ I-Zellen des Glomus caroticum vorhanden ist und dort als O_2 -Sensor agiert (Acker et al., 1989; Cross et al., 1990; Kummer und Acker, 1995).

Die NADPH-Oxidase der Neutrophilen besteht aus dem membrangebundenen Flavoprotein Cytochrom b_{558} , welches seinerseits aus zwei Proteinkomponenten (p22phox und gp91phox) gebildet wird. Weitere Proteinkomponenten der NADPH-Oxidase sind die zytosolischen Aktivierungsfaktoren p47phox und p67phox (Bastian and Hibbs, 1994). Die NADPH-Oxidase reduziert molekularen Sauerstoff in das Superoxidion $O_2^{\cdot-}$, welches dann weiter zu Wasserstoffperoxid H_2O_2 dismutiert (Karnovsky, 1994). Die gebildeten ROS werden zur Abwehr pathogener Mikroorganismen verwendet.

Nach Acker und Xue (1995) handelt es sich bei dem zunächst nur im Glomus caroticum und in EPO-produzierenden HepG2-Zellen (Görlach et al., 1993) entdeckten Cytochrom b um ein in der Zellmembran lokalisiertes Hämprotein, welches Ähnlichkeiten mit dem in Neutrophilen und Makrophagen vorkommenden Cytochrom b_{558} der NADPH-Oxidase aufweist. Nach ihrer Hypothese ist diese das Cytochrom b_{558} enthaltende NADPH-Oxidase in der Lage, in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration H_2O_2 zu produzieren. Das gebildete H_2O_2 dient als second messenger und reguliert die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen und die Expression von bestimmten Genen, wie z. B. EPO (Acker H, 1994; Acker und Xue, 1995).

Auch Youngson et al. (1993) konnten in der Plasmamembran von Neuroepithelkörperchen der Lunge das Vorkommen eines Cytochroms b nachweisen. Sie nahmen ebenfalls an, dass es sich dabei um den Bestandteil einer NADPH-Oxidase handelt. Wang et al. (1996) erweiterten diese Untersuchungen und schlussfolgerten, dass es sich bei den Neuroepithelkörperchen der Lunge um chemosensitive Zellen handelt, die einen Sauerstoffsensorkomplex besitzen, der aus einer NADPH-Oxidase besteht, welche in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration H_2O_2 produziert und damit H_2O_2 -sensitive Kaliumkanäle beeinflusst.

Verschiedene Proteinkomponenten der NADPH-Oxidase wurden auch in anderen O₂-sensitiven Zellen (Kummer und Acker, 1997) nachgewiesen, wie z.B. in SIF-Zellen (= small intensely fluorescent) aus sympathischen Ganglien (Kummer und Acker, 1997), in Lungenendothelzellen (Höhler et al. 2000) und in sensiblen Neuronen der Ratte (Dvorakova et al., 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es verschiedene Subtypen der NADPH-Oxidase in nicht-phagozytierenden Zellen gibt. Diese werden als Mox 1, Mox 2, ThOX 1, ThOX 2 und Renox bezeichnet (Suh et al., 1999; Ullrich und Bachschmidt, 2000; Geiszt et al., 2000). Mox 1 wurde von Suh und Mitarbeitern (1999) in glatten Muskelzellen, im Kolon, in der Prostata und im Uterus nachgewiesen. Mox 1 weist eine homologe Struktur wie die katalytische Untereinheit gp91phox der phagozytären NADPH-Oxidase auf. Bislang konnten fünf zur gp91phox-Untereinheit homologe Strukturen auch in nicht-phagozytierenden Zellen entdeckt werden, die nach neuer Terminologie als Nox 1-5 bezeichnet werden. Nox 2 bezeichnet den katalytischen Kern gp91phox der NADPH-Oxidase der Phagozyten (Arnold et al., 2001; Cheng et al., 2001; Lassegue et al., 2001; Takeya et al., 2003).

Verschiedene Arbeitsgruppen äußerten Zweifel an der Hypothese, dass eine NADPH-Oxidase, ähnlich der in Neutrophilen und Makrophagen vorkommenden, in chemosensitiven Zellen als O₂-Sensor fungiert:

Die immunhistochemischen Experimente der Arbeitsgruppe Dvorakova et al. (1999) konnten ein ubiquitäres Vorkommen des Cytochroms b₅₅₈ in Neuronen des Ganglion petrosum und der DRGs der Ratte nachweisen. Dieses ubiquitäre Vorkommen deutet eher auf eine allgemeine Funktion des Cytochroms b₅₅₈ im Metabolismus von sensiblen Neuronen hin, als auf die Möglichkeit, dass es sich bei dem Cytochrom b₅₅₈ um den O₂-Sensor der chemorezeptiven Neurone handelt. Kummer et al. (1999) konnten eine Untereinheit des Cytochroms b₅₅₈ in der Membran der sekretorischen Vesikel von Nebennierenmarkszellen nachweisen. Bei der von Acker und Xue (1995) aufgestellten Theorie der NADPH-Oxidase handelt es sich aber um ein plasmamembrangebundenes Enzym. Youngson und Mitarbeiter (1997) lokalisierten das Cytochrom b₅₅₈ in kultivierten Zellen des Glomus caroticum mittels der Immunfluoreszenztechnik in der Plasmamembran oder aber dem Zytoplasma der Zellen. Das subzelluläre Vorkommen des Cytochroms b₅₅₈ in Vesikeln von Nebennierenmarkszellen lässt die Funktion der NADPH-Oxidase als O₂-Sensor aber eher anzweifeln (Kummer et al., 1999). Dvorakova et al. (2000) konnten schließlich durch licht- und elektronenmikroskopische

Untersuchungen nachweisen, dass die Hauptquelle des Cytochroms b_{558} im Glomus caroticum der Ratte in den dort vorkommenden Monozyten und Makrophagen liegt. Das reichhaltige Vorkommen des Cytochroms b_{558} in diesen Zellen erklärt das gefundene spektrophotometrische Absorptionsmaximum von 558 nm im Glomus caroticum von Ratten. Die Schlussfolgerung, dass aufgrund dieses Absorptionsmaximums im Glomus caroticum ein als O_2 -Sensor fungierendes Cytochrom b_{558} existiert (Cross et al., 1990; Acker et al., 1992), ist demnach nicht berechtigt.

Die Arbeitsgruppe von Wenger et al. (1996) konnten bei an chronischer Granulomatose erkrankten Patienten nachweisen, dass die phagozytäre NADPH-Oxidase (Nox 2) nicht in Zusammenhang mit einer hypoxie-bedingten EPO- oder VEGF-Produktion steht. Die chronische Granulomatose beruht auf einem genetischen Defekt der NADPH-Oxidase, welcher zu einer Störung der intrazellulären Keimabtötung in den Granulozyten durch fehlende H_2O_2 -Produktion führt. Wenger et al. (1996) stellten fest, dass eine B-Zelllinie von Patienten mit chronischer Granulomatose (cytb-CGD-derived B cell line) immer noch in der Lage war, adäquat auf Hypoxie mit Transkriptionssteigerung zu reagieren. Auch EPO- und VEGF-mRNA konnten von diesen Zellen in normalen Mengen gebildet werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die NADPH-Oxidase nicht in Zusammenhang mit der durch Hypoxie aktivierten EPO- oder VEGF-Produktion steht. Die phagozytäre NADPH-Oxidase kann deshalb als Kandidat für einen mutmaßlichen O_2 -Sensor weitgehend ausgeschlossen werden.

2.3.5 Die mitochondriale ROS-Hypothese für das O_2 -Sensormodell

Die Tatsache, dass Mitochondrien für den Großteil des Sauerstoffverbrauchs in der Zelle verantwortlich sind, legt nahe, dass Mitochondrien als O_2 -Sensoren der Zelle in Frage kommen. Während der mitochondrialen Atmung wird Sauerstoff durch den Transfer von vier Elektronen über die Cytochrom-c-Oxidase zu Wasser reduziert. Die resultierende freie Energie wird zur ATP-Synthese verwendet. Dabei werden 2-3% des von den Mitochondrien konsumierten Sauerstoffs nur inkomplett reduziert, und es kommt zur Bildung von ROS in Form von $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 (Chance und Williams, 1955; Chance et al., 1979).

Verschiedene Forschungsergebnisse stellen einen Zusammenhang zwischen den von den Mitochondrien gebildeten ROS und dem O₂-Sensormechanismus her:

Untersuchungen von Chandel et al. (1998) und Duranteau et al. (1998) unterstützen die Hypothese, dass die in Mitochondrien gebildeten ROS eine physiologische Rolle bei der zellulären Antwort auf Hypoxie spielen:

Chandel et al. (1998) testeten, ob die während einer Hypoxiephase vermehrt gebildeten ROS aus den Mitochondrien stammen. Sie testeten ebenfalls, ob die Erhöhung der ROS unter Hypoxie für eine Aktivierung der Transkription von EPO, VEGF und glykolytischen Enzymen verantwortlich ist. Außerdem untersuchten sie, inwieweit sich die Situation unter Hypoxie durch die Zugabe von CoCl₂ nachahmen lässt.

Als Grundlage dienten Chandel et al. (1998) die Forschungsergebnisse von Goldberg und Schneider (1994), nach denen bei Hep3B-Zellen die Produktion von EPO und VEGF sowohl durch Hypoxie als auch durch CoCl₂ stimuliert werden kann.

Chandel et al. (1998) stellten fest, dass Hep3B-Zellen vom Wildtyp sowohl auf Hypoxie als auch auf die Zugabe von CoCl₂ mit einem Anstieg der ROS reagierten. Hep3B-Zellen, denen die mitochondriale DNA fehlt (rho⁰-Zellen), zeigten unter Hypoxie keinen Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration. Auch die Produktion von EPO, VEGF und glykolytischen Enzymen blieb aus. Auf die Zugabe von CoCl₂ reagierten die rho⁰-Zellen jedoch sowohl mit einem Anstieg der ROS, als auch mit einer Produktion von EPO, VEGF und glykolytischen Enzymen. Chandel et al. (1998) schlussfolgerten daraus, dass Hypoxie die Transkription von EPO, VEGF und glykolytischen Enzymen über eine Erhöhung mitochondrialer ROS aktiviert, wohingegen die Transkriptionsaktivierung der genannten Faktoren bzw. Enzyme und die Erhöhung der ROS durch CoCl₂ über einen von den Mitochondrien unabhängigen Mechanismus stimuliert wird.

Budinger et al. (1996) stellten fest, dass die Kontraktionsfähigkeit und der Sauerstoffverbrauch von Kardiomyozyten unter Hypoxie abnehmen. Duranteau et al. (1998) untersuchten den Mechanismus, der die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten unter Hypoxie steuert. Insbesondere interessierte Duranteau und Mitarbeiter (1998), ob die abnehmende Kontraktionsfähigkeit der Zellen unter Hypoxie durch ROS verursacht wird, und woher diese ROS stammen. Zu diesem Zweck inkubierten Duranteau et al. (1998) die Kardiomyozyten mit dem für ROS (insbesondere H₂O₂) spezifischen Fluoreszenzindikator DCFH-DA unter Hypoxie und

Normoxie. Unter Hypoxie konnte ein Anstieg der DCF-Fluoreszenz festgestellt werden. Die Konzentration der ROS in Kardiomyozyten unter Hypoxie nahm zu.

Unter normoxischen Bedingungen verminderten Kardiomyozyten, die mit H₂O₂ inkubiert wurden, ihre Kontraktionsfähigkeit. Die Zugabe des Antioxidans 2-Mercaptopropionyl-glycin schwächte die Zunahme der ROS-Konzentration ab und führte zu einer vermehrten Kontraktion der Kardiomyozyten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ROS als second messenger dienen, welche unter Hypoxie gebildet werden und zu einer verminderten Kontraktion von Kardiomyozyten führen. Um festzustellen, woher die unter Hypoxie gebildeten ROS stammen, inkubierten Duranteau et al. (1998) die unter Hypoxie mit DCFH-DA inkubierten Kardiomyozyten mit unterschiedlichen Hemmstoffen der mitochondrialen Elektronentransportkette. Die DCF-Fluoreszenz der mit Rotenon (Hemmstoff von Komplex I der Elektronentransportkette) inkubierten Zellen nahm unter Hypoxie ab, die Fluoreszenz der mit Antimycin A (Hemmstoff von Cytochrom b₅₆₆, stabilisiert Ubisemiquinon) inkubierten Zellen nahm unter Hypoxie zu. Daraus schlussfolgerten Duranteau et al. (1998), dass die unter Hypoxie gebildeten ROS aus den Mitochondrien stammen. Mitochondrien kämen demnach als O₂-Sensoren in Frage.

Die Arbeitsgruppe von Chandel et al. (2000) konnte an der auf Hypoxie mit Luciferasebildung reagierenden transfizierten Nierenzelllinie 293 und einer humanen Hepatomzelllinie (Hep3B) nachweisen, dass es unter Hypoxie zu einer Akkumulation von HIF-1 α kommt, dem Transkriptionsfaktor, welcher in diesen Zellen die Luciferasebildung initiiert. Diese Antwort auf Hypoxie erfolgt hingegen nicht in Zellen, denen die mitochondriale DNA fehlt (rho⁰-Zellen). Während einer Normoxiephase exogen zugeführtes H₂O₂ stabilisierte die HIF-1 α -Untereinheit und führte zur Luciferasebildung sowohl in Wildtyp als auch in rho⁰-Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die in den Mitochondrien gebildeten ROS verantwortlich und notwendig sind, um die HIF-1 α -Untereinheit zu stabilisieren.

Die Untersuchungen von Chandel et al. (2000) könnten darauf hinweisen, dass es sich bei den Mitochondrien um die O₂-Sensoren der Zelle handelt, die auf Hypoxie mit einer vermehrten Bildung von ROS reagieren. Diese ROS könnten zu einer Stabilisation der HIF-1 α -Untereinheit führen, welche in Säugetierzellen für die Transkription einer Reihe von Genen, wie z. B. EPO und VEGF, verantwortlich ist.

Durch den Einsatz verschiedener Hemmstoffe der mitochondrialen Atemkette folgerten Chandel et al. (2000), dass die ROS an Komplex III der mitochondrialen Atmungskette gebildet werden. Die Experimente von Paddenberg et al. (2003) an glatten Muskelzellen der Pulmonalgefäße weisen jedoch den Komplex II der mitochondrialen Atmungskette als Quelle der hypoxisch-induzierten ROS-Produktion in diesem Zelltyp aus.

2.4 Rotenon: Komplex I-Inhibitor und Aktivator der ROS-Produktion

Die mitochondriale Elektronentransportkette besteht aus vier Atmungskettenkomplexen, welche einzeln durch spezifische Inhibitoren blockiert werden können.

Rotenon ist ein spezifischer Hemmstoff von Komplex I (auch als NADH-Dehydrogenase bezeichnet) der mitochondrialen Atmungskette (Genova et al., 1997; Seaton et al., 1997). Die NADH-Dehydrogenase katalysiert den in Stufen ablaufenden Elektronentransfer von NADH zum Ubichinon über Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S) (Ragan, 1990; Friedrich et al., 1990). Rotenon inhibiert den Elektronentransfer zwischen den Fe-S und Ubichinon (Palmer et al., 1968).

Durch die Inhibition des Elektronentransfers an Komplex I führt Rotenon bei unterschiedlichen Zelltypen, jedoch nicht allen, zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration mitochondrialer ROS. So stellte beispielsweise die Arbeitsgruppe von Barrientos und Moraes (1999) bei Experimenten an einer humanen Osteosarkom-Zelllinie nach Rotenon-Behandlung eine erhöhte ROS-Bildung fest. Auch Höhler et al. (1999) wiesen einen durch Rotenon verursachten ROS-Anstieg bei PC12-Zellen nach. Hensley et al. (1998) inkubierten isolierte Gehirnmitochondrien mit Rotenon und stellten ebenfalls eine erhöhte ROS-Bildung in Form von H_2O_2 an Komplex I der mitochondrialen Atmungskette fest. Die Elektronen verlassen die Elektronentransportkette in den Gehirnmitochondrien dabei über ein „Elektronenleck“ noch vor der Rotenonbindungsstelle und bilden in Verbindung mit Sauerstoff ROS.

Rotenon erscheint demnach als Positivkontrolle zum Nachweis einer gesteigerten ROS-Produktion in neuronalen Zellen geeignet.

2.5 Phorbol-12-myristat-13-acetat: Aktivator der Protein Kinase-C und der ROS-Produktion

Bei Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) handelt es sich um einen Aktivator der Protein Kinase-C (PKC) (Niedel et al., 1983). Diese phosphoryliert die Proteine des NADPH-Oxidase-Komplexes in Phagozyten und führt somit zum sogenannten "respiratory burst" (Heinecke et al., 1990, Regier et al., 2000). Beim "respiratory burst" werden ROS durch die phagozyteneigene NADPH-Oxidase (Nox 2) produziert, was zur Abtötung von pathogenen Mikroorganismen führt. Eine ROS produzierende NADPH-Oxidase konnte aber nicht nur in Phagozyten nachgewiesen werden, sondern auch in verschiedenen anderen Zelltypen, wie z. B. in Lungenfibroblasten, in glomerulären Mesangiumzellen und in glatter Gefäßmuskulatur (Thannikal und Fanburg, 1995; Jones et al., 1995; Fukui et al., 1995). Die ROS produzierende NADPH-Oxidase kommt auch in sympathischen (Tammariello et al., 2000) und in sensiblen Neuronen der Ratte vor (Dvorakova et al., 1999). Noh und Koh (2000) stellten zudem fest, dass die in Neuronen und Astrozyten vorkommende NADPH-Oxidase durch die PKC aktiviert wird. Die PKC konnte dabei durch PMA stimuliert werden.

Die Aktivierung der PKC durch PMA führt zu einer Stimulation der NADPH-Oxidase und zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS in verschiedenen Zelltypen. Murphy et al. (2000) konnten z. B. nach Stimulation mit PMA einen Anstieg der durch die NADPH-Oxidase gebildeten ROS in mikrovaskulären Endothelzellen aus der Lunge von Mäusen feststellen. Auch Höhler et al. (2000) wiesen eine durch PMA ausgelöste Bildung von ROS an arteriellen Endothelzellen aus dem Truncus pulmonalis vom Schwein nach. Ebenso zeigten die von Inoguchi et al. (2000) mit PMA inkubierten humanen Endothelzellen und glatten Muskelzellen aus der Aorta eine erhöhte ROS-Produktion.

PMA erscheint demnach ebenfalls als Positivkontrolle zum Nachweis einer gesteigerten ROS-Produktion in neuronalen Zellen geeignet.

2.6 Messung intrazellulärer ROS-Bildung durch Fluoreszenzindikatoren

Die Bildung intrazellulärer ROS kann durch Fluoreszenzindikatoren nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Fluoreszenzindikatoren sollten dabei in der Lage sein, die Zellmembran zu penetrieren und signifikante intrazelluläre Konzentrationen zu erreichen. Die Indikatoren sollten zudem eine minimale zelluläre Toxizität aufweisen. Die Konversion der Indikatoren von einer nicht-fluoreszierenden zu einer fluoreszierenden Form sollte spezifisch für ROS sein. Außerdem sollte die oxidierte, fluoreszierende Form der Indikatoren die Zelle nicht mehr verlassen können (Royall und Ischiropoulos, 1993).

Die farblosen Fluoreszenzindikatoren Dihydrorhodamin 123 (H_2R) und 2',7'-Dichlorofluoreszein-Diazetat (DCFH-DA) sind für diesen Zweck gut geeignet. Die intrazellulär gebildeten ROS (v.a. H_2O_2) oxidieren die beiden farblosen Substanzen zu ihren fluoreszierenden Metaboliten Rhodamin 123 und 2',7'-Dichlorofluoreszein (DCF) (Cathcart et al. 1983; Bass et al., 1983; Rothe et al., 1988; Royall und Ischiropoulos, 1993; Carter et al., 1994; Dugan et al., 1995; Crow 1997).

Das fluoreszierende Endprodukt von H_2R ist das positiv geladene Rhodamin 123, welches ursprünglich als Lebendmarker für Mitochondrien verwendet wurde und einer intrazellulären Sequestrierung unterliegt (Royall und Ischiropoulos, 1993).

DCFH-DA stellt die membranpermeable, nicht-fluoreszierende Form des Farbstoffes dar. Nach Passage der Zellmembran kommt es zu einer intrazellulären Esterabspaltung, die den reduzierten Farbstoff DCFH daran hindert, die Zelle wieder zu verlassen. Die intrazellulären ROS oxidieren DCFH zu dem fluoreszierenden Endprodukt DCF (Royall und Ischiropoulos, 1993; Duranteau et al., 1998).

Mittels eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes kann die Fluoreszenzintensität der beiden Indikatoren gemessen werden. Die Fluoreszenzintensität korreliert direkt mit der intrazellulären ROS-Konzentration (Royall und Ischiropoulos, 1993; Sawada et al., 1996; Possel et al., 1997; Chandel und Schumacker, 2000).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tiere

Für die Versuchsreihen wurden insgesamt 27 Ratten der Zuchtlinie "Wistar-Unilever" der Firma Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, BRD, benötigt. Es handelte sich um Albinos beiderlei Geschlechts im Alter von 6 bis 16 Wochen.

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chloroform	Merck, Darmstadt
D-Glucose	Merck, Darmstadt
2', 7'-Dichlorofluoreszein-Diazetat (DCFH-DA)	Calbiochem, Schwalbach
Dinatriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dihydrorhodamin	Sigma, Deisenhofen
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt

Kollagenase	Boehringer, Mannheim
Lipid-Proteinkomplex	Biochrom KG, Berlin
Low-melting Agarose	Bio-Rad Laboratories, München
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Nerve growth factor (NGF)	Alomone labs, München
Nitrobluetetrazolium	Biomol, Hamburg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin PAA	Cölbe
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Rotenon	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Merck, Darmstadt
Trypsin	Sigma, Deisenhofen

3.1.3 Lösungen, Medien und Puffer

Dulbecco's Modified

Eagle Medium (D-MEM)

Life Technologies, Eggestein

Fixationslösung

40 g Paraformaldehyd und 500 ml aqua dest werden langsam auf ca. 70°C erhitzt; die Zugabe von einigen Tropfen 2 M Natronlauge klärt die Lösung. Nach dem Abkühlen der Lösung werden 500 ml eines 0,2 M Phosphatpuffers zugegeben. Dieser setzt sich aus 115 ml der Lösung A und 385 ml der Lösung B zusammen, deren Gemisch auf einen pH von 7,4 eingestellt wird (Herstellung der Lösungen A und B ⇒ siehe Herstellung von phosphatgepufferter Salzlösung). Der pH-Wert der Fixationslösung wird auf 7,2 bis 7,4 eingestellt. Die Lösung wird durch einen 3,0 µm und einen 6,0 µm Porenfilter (Sartorius, Goettingen) membranfiltriert.

gepuffertes Glycerol

Zwei Teile Glycerol werden mit einem Teil Puffer gemischt. Der Puffer wird aus 50 ml einer 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung hergestellt und mit einer 0,5 M Dinatriumcarbonatlösung auf einen pH Wert von 8,6 eingestellt.

Krebs-Ringer-Lösung

Zur Herstellung von Krebs-Ringer-Lösung werden

0,35 g Kaliumchlorid,

7,8 g Natriumchlorid,

0,21 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat,

1,37 g Natriumhydrogencarbonat,

0,15 g Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)

und 1,4 g D-Glukose

in 1 l aqua dest aufgelöst. Nach 10-minütiger Carbogenbegasung werden 2,8 ml einer 1 M Kalziumchloridlösung zugefügt. Die Lösung wird durch einen 3,0 µm und einen 6,0 µm Porenfilter (Sartorius) membranfiltriert.

Locke'sche Lösung

In 125 ml aqua dest werden

0,34 g Natriumchlorid,
0,51 g Hepes,
0,44 g Sacharose
und 0,13 g Glucose

gelöst. Die Lösung wird auf einen pH-Wert von 7,28 eingestellt. Anschließend werden 0,039 g Kalziumchlorid zugegeben. Die Lösung wird mit einem Membranfilter mit der Porengröße 0,2 µm (Sartorius, Göttingen) membranfiltriert.

Low-melting Agarose

in Krebs-Ringer-Lösung

0,6 g Low-melting Agarose werden mit 20 ml Krebs-Ringer-Lösung dreimal zum Sieden gebracht. Anschließend wird die Agarose bis zur Abkühlung auf 37°C in einen auf 37°C temperierten Wärmeschrank gestellt.

phosphatgepufferte

Salzlösung (PBS)

Zur Herstellung von Lösung A werden 27,6 g Natriumdihydrogenphosphat in einem Liter aqua dest gelöst; zur Herstellung von Lösung B werden 35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat in einem Liter aqua dest gelöst. Für die Gebrauchslösung werden 28,75 ml der Lösung A mit 96,20 ml der Lösung B

vermischt. Nach Zugabe von 22,4 g Natriumchlorid wird die Lösung mit aqua dest auf 5000 ml aufgefüllt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

phosphatgepufferte

Salzlösung (PBS)

in Kombination mit

Nitrobluetetrazolium

In 20 ml PBS (Rezept siehe oben) werden 2 mg Nitrobluetetrazolium gelöst

RPMI-Medium

Life Technologies, Eggestein

TNB-Medium

Biochrom KG, Berlin

TNB-Medium-Gemisch

500 ml TNB werden mit 2 ml Lipid-Proteinkomplex und 1 ml 1% Penicillin gemischt.

TNB-Medium-Gemisch

+NGF

10 ml TNB-Medium-Gemisch werden mit 50 µl NGF gemischt.

3.1.4 Geräte

Folgende Geräte fanden in der Versuchsdurchführung und -auswertung Verwendung:

Konfokales Laserscanning-Mikroskop

LSM 10 der Firma Zeiss, Jena, BRD

Vibratom

1000 VT S der Firma Leica, Nussloch, BRD

Brutschrank

Typ BB 16, Heraeus, Hanau, BRD

Wärmeschrank

Typ B 5042, Heraeus, Hanau, BRD

3.2 Methoden

3.2.1 Messungen an dissoziierten Spinalganglienneuronen

3.2.1.1 Präparation

Die Tiere wurden durch Chloroform-Inhalation betäubt. Die Halsschlagader wurde durchtrennt. Der Tod trat durch Entbluten ein. Längs der Wirbelsäule wurde vom Kreuzbein bis zu den ersten Brustwirbeln der Tiere ein Hautschnitt gesetzt, um die darunterliegende Muskulatur freizulegen. Die Muskulatur wurde mittels zweier Schnitte, jeweils links und rechts der Wirbelsäule in ebenfalls zur Wirbelsäule parallel verlaufender Richtung, von der Wirbelsäule getrennt. Mit Hilfe einer spitzen Lüerschen Zange wurde die Wirbelsäule in Höhe des letzten Brustwirbels durchtrennt. Durch Einführen der Zangenspitzen abwechselnd links und rechts in den Wirbelkanal und Durchtrennung der seitlichen Wirbelbögen wurde der Wirbelkanal fortlaufend vom letzten Brustwirbel bis zum Kreuzbein freigelegt. Dabei wurde das Rückenmark geschont. Im Anschluss wurde das Rückenmark vorsichtig mit einer feinen Pinzette angehoben, um die seitlich abgehenden Spinalnerven in ihrem Verlauf bis zu den Spinalganglien (DRG = dorsal root ganglia) verfolgen zu können. Die im Canalis intervertebralis liegenden DRGs wurden mit Hilfe einer Federschere abgetrennt und sofort in auf 37°C angewärmtes D-MEM-Medium gegeben. Die einzelnen Schritte der Präparation wurden zügig durchgeführt, um ein Weiterleben der Nervenzellen zu ermöglichen (Zeitraumen ca. 15 Min.).

3.2.1.2 Dissoziation und Zellkultur

Die Ganglien wurden vorsichtig mit einer silikonisierten Pasteurpipette aufgezogen und in 3 ml Kollagenase pipettiert. Das Gemisch wurde 50 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Ganglien zweimal mit D-MEM-Medium gewaschen (Zentrifugation bei 3000 U/min, Dauer: 5 Minuten.). Nach Zugabe von 3 ml Trypsin wurden die DRGs ein zweites Mal bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden drei weitere Waschvorgänge mit D-MEM durchgeführt. Die Öffnung

der dabei benutzten silikonisierten Pasteurpipetten wurde mittels einer Flamme bei jedem Waschvorgang etwas enger geschmolzen. Die Ganglien wurden vorsichtig trituiert bis zu einer gut sichtbaren Dissoziation einzelner Zellen. In den drei darauf folgenden Waschvorgängen wurde zweimal D-MEM-Medium und zuletzt TNB-Medium-Gemisch verwendet. Die dissoziierten Zellen wurden in 600 µl TNB-Medium-Gemisch + NGF (nerve growth factor) aufgenommen und gut vermischt. Jeweils 50 µl der Suspension wurden in jeweils eine Vertiefung zweier mit Poly-L-Lysin beschichteten Culture Slides mit einem 8-Kammer-Aufsatz zur Zellkultur gegeben. Die Culture Slides wurden zwei Stunden im Brutschrank (37°C) inkubiert. Anschließend wurde pro Vertiefung 0,5 ml TNB-Medium-Gemisch zugesetzt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.3 ROS-Messung mit Fluoreszenzindikatoren

3.2.1.3.1 Reagenzien

Die Kammerung der Objektträger in 8 Näpfe ermöglichte die variable Kombination verschiedener Reagenzien an einem Versuchstag (Abb.1).

L1	L2	R1	R2	
L3	L4	R3	R4	

Abb. 1: 8fache Kammerung eines Objektträgers für variable Substanzkombinationen (schematisch dargestellt).

Das Medium der beiden Culture Slides wurde vor Versuchsbeginn abgesaugt und durch folgende Substanzen ersetzt:

Abkürzung	Indikator	Vehikel	Konzentration
DCFH-DA	2',7'Dichlorofluorescein-Diazetat	RPMI-Medium	1 μ M
H ₂ R	Dihydrorhodamin 123	Locke'sche Lösung	25 μ M

Tabelle 1: In den Experimenten verwendete Substanzen mit Angabe ihrer Abkürzungen und Konzentrationen im jeweiligen Versuchsansatz.

In jeden Napf wurden 0,5 ml des jeweiligen Versuchsansatzes pipettiert.

3.2.1.3.2 Kombination der eingesetzten Substanzen

Fluoreszenz-indikator	20 % O ₂	1 % O ₂
H ₂ R	mit Rotenon	mit Rotenon
DCFH-DA	mit Rotenon	mit Rotenon
H ₂ R	ohne Rotenon	ohne Rotenon
DCFH-DA	ohne Rotenon	ohne Rotenon

Tabelle 2: Kombination der eingesetzten Substanzen in unterschiedlichen Versuchsansätzen (Konzentration Rotenon 20 mM).

3.2.1.3.3 Inkubation der Zellen

Anschließend wurden die Objektträger unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert: Ein Objektträger wurde in einer Plastikbox unter normoxischen Bedingungen im Brutschrank bei 20% O₂, 5% CO₂ und 75% N₂ (Messer Griesheim) bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Der andere Objektträger wurde in einer abgedichteten Plastikbox mit einem Volumen von 300 ml ebenfalls für 1 Stunde bei 37°C unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Dazu wurde über eine Schlauchkonstruktion im Deckel der Box kontinuierlich ein Festgemisch, bestehend aus 1 % O₂, 5% CO₂ und 94% N₂ (Messer Griesheim), in die Box geleitet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Plastikboxen über eine Öffnung im Deckel mit Fixationslösung geflutet, um eine Reoxygenierung der unter hypoxischen Bedingungen inkubierten Zellen durch den Sauerstoff in der Raumluft zu vermeiden. Die Fixationslösung wurde 10 Minuten auf den Zellen belassen.

Im Anschluss an die Fixation wurden die Zellen zur Entfernung des überschüssigen Fluoreszenzindikators und der Fixationslösung dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und mit gepuffertem Glycerol eingedeckelt. Die Objektträger wurden auf Eis und im Dunkeln gelagert, um eine temperatur- und lichtbedingte Radikalbildung zu vermeiden.

3.2.1.3.4 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die Auswertung der Objektträger erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes. Dabei wurden das 20er Objektiv und der 2er Zoom benutzt. Die Messungen erfolgten im nichtkonfokalen Modus bei einer Scanzeit von 32 Sekunden. Die Laserwellenlänge betrug 488 nm. Vor der Messung musste die Einstellung der Empfindlichkeit des Gerätes zur Bestimmung geeigneter Kontrast- und Helligkeitswerte erfolgen. Dazu wurden die beiden Objektträger jeweils einmal probegescannt, wobei durch Veränderung von Kontrast und Helligkeit geeignete Werte gefunden wurden, um sowohl bei sehr hoher als auch bei sehr niedriger Fluoreszenzintensität der Zellen eines Objektträgers eine Auswertung zu ermöglichen.

3.2.1.3.5 Messreihenfolge und -vorgang

Die beiden Objektträger wurden als Blindversuch ausgewertet. Dazu wurden die Objektträger kodiert. Die Kodierung wurde für die Auswertung überdeckt. Da die Fluoreszenzindikatoren Rhodamin 123 und DCF bei unterschiedlichen Kontrast- und Helligkeitswerten gemessen werden mussten, wurden die Messungen erst bei dem einen, dann bei dem anderen Fluoreszenzindikator vorgenommen. Die beiden Objektträger wurden nacheinander mit den für jeden Fluoreszenzindikator separat gefundenen Kontrast- und Helligkeitswerten durchgescannt. Pro Napf wurden bis zu 10 Zellen gemessen. Dazu wurden die Umrisse der Zellen auf dem Bildschirm umfahren und die Fluoreszenzintensität über die konfokale Laserscanningsoftware bestimmt. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde in Grauwerten auf einer Skala von 0 bis 255 wiedergegeben.

3.2.2 ROS-Messungen an vitalen Spinalganglienschnitten

3.2.2.1 Präparation

Die Präparation der Spinalganglien erfolgte auf die gleiche Art und Weise, wie unter Punkt 1.1 beschrieben. Im Unterschied zu Punkt 1.1 wurden die DRGs im Anschluss an die Präparation jedoch nicht in D-MEM-Medium gegeben, sondern in eisgekühlte Krebs-Ringer-Lösung.

3.2.2.2 Herstellung der Vitalschnitte

Eine halbierte Petrischale wurde mit 20 ml einer auf 37°C temperierten Low-melting Agarose in Krebs-Ringer-Lösung gefüllt. Die DRGs wurden mit einer Pinzette in Gruppierungen von zwei bis drei unmittelbar nebeneinandergelagerten Ganglien auf den Boden der mit warmer Agarose gefüllten Petrischale gegeben. Unmittelbar im Anschluss wurde die Petrischale mit ihrem Inhalt für ca. 3 Minuten auf Eis gelagert, um die Agarose zum Erstarren zu bringen. Nach dem Erstarren wurde die Agarose mit Hilfe

einer Skalpellklinge um die eingelagerten DRGs herum trapezförmig ausgeschnitten (siehe Abb. 2).

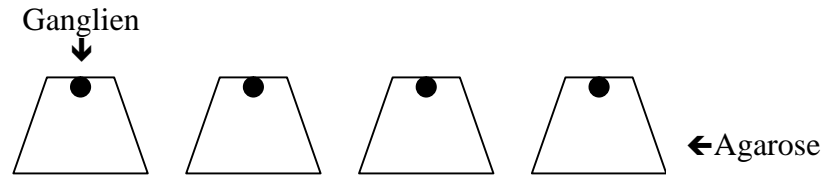


Abb. 2: Trapezförmig geschnittene Agarose-Blöckchen (Low-melting Agarose) mit eingelagerten Spinalganglien.

Die so entstandenen Blöckchen wurden mit Hilfe von Sekundenkleber (Uhu, Beiersdorf, Hamburg) mit ihrer breiten Unterseite nebeneinander auf den Objektträger des Vibratoms geklebt. Das über ein Schlauchsystem mit Wasser gekühlte Schnittbecken des Vibratoms wurde mit gekühlter Krebs-Ringer-Lösung gefüllt. Der Objektträger mit den aufgeklebten Ganglienblöckchen wurde mittels einer vorhandenen Schraubenkonstruktion am Boden des Schnittbeckens befestigt. Die Blöckchen waren dabei gut mit Krebs-Ringer-Lösung bedeckt. Das Vibratom wurde auf eine Schnittdicke von 100 μm eingestellt. Nach Justierung der im Vibratom eingespannten Rasierklinge auf einen Punkt kurz vor und einen Punkt kurz nach den Ganglienblöckchen wurde das Vibratom mit einer Schnittgeschwindigkeit von 3 und einer Vibrationsstärke von 10 gestartet. Die entstandenen Vitalschnitte der Spinalganglien wurden aus dem Schnittbecken mit Hilfe einer Pinzette in vier mit RPMI-Medium gefüllte Siebeinsätze einer 6er Multiwellplatte gegeben.

3.2.2.3 ROS-Messung mit dem Fluoreszenzindikator DCFH-DA

3.2.2.3.1 Inkubation der Vitalschnitte mit DCFH-DA

Jeweils zwei der Siebeinsätze der ersten 6er Multiwellplatte wurden auf je zwei Näpfe zweier weiterer 6er Multiwellplatten verteilt, welche mit jeweils 3 ml RPMI-Medium bzw. 3 ml DCFH-DA in Kombination mit RPMI-Medium gefüllt waren (siehe Tab. 3).

20 % O ₂	1% O ₂
Vitalschnitte in DCFH-DA (1 µM) + RPMI-Medium	Vitalschnitte in DCFH-DA (1 µM) + RPMI-Medium
Vitalschnitte in RPMI-Medium	Vitalschnitte in RPMI-Medium

Tabelle. 3: *Kombination der Vitalschnitte mit Fluoreszenzindikator und Medium während der Inkubation bei Hypoxie (1 % O₂) und Normoxie (20 % O₂).*

Anschließend wurden die Vitalschnitte der einen Multiwellplatte unter hypoxischen Bedingungen, die Vitalschnitte der anderen Multiwellplatte unter normoxischen Bedingungen eine Stunde wie folgt inkubiert:

Die beiden Multiwellplatten wurden in zwei Plastikboxen gestellt und getrennt in zwei Wärmeschränken bei einer Temperatur von 37°C aufbewahrt. Über eine Schlauchkonstruktion im Deckel der Boxen konnten die in RPMI-Medium schwimmenden Vitalschnitte der einen Box mit einem Festgemisch (Messer, Griesheim), bestehend aus 20% O₂, 5% CO₂ und 75% N₂ (normoxische Bedingung), begast werden, während die Vitalschnitte in der anderen Box mit einem Festgemisch (Messer, Griesheim) aus 1% O₂, 5% CO₂ und 94% N₂ (hypoxische Bedingung) begast wurden. Im Laufe der Versuchsreihen wurden unterschiedliche Begasungsarten

gewählt, um die Versuchsbedingungen zu optimieren. So wurde zu Beginn der Versuchsreihen die Gasphase in den Plastikboxen über das Schlauchsystem ausgetauscht. Die Änderung der O₂-Konzentration erfolgte erst zum Zeitpunkt der Zugabe der vitalen Ganglienschnitte. Bei den darauffolgenden Versuchsreihen wurde das Gasgemisch über an das Schlauchsystem angeschlossene Kanülen direkt in das Medium geleitet. Der Zeitpunkt der Begasung erfolgte schon eine Stunde vor Zugabe der vitalen Ganglienschnitte. Unterschiede in den Ergebnissen durch diese verschiedenen Begasungsarten waren nicht festzustellen. Bei der Inkubation wurde auf Dunkelheit geachtet, um eine lichtbedingte Radikalbildung zu vermeiden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit von einer Stunde wurde jeder der 4 Näpfe über die im Deckel der Box befindlichen Öffnungen mit Fixationslösung geflutet, um eine Reoxygenierung der Vitalschnitte durch den Sauerstoff der Raumluft zu vermeiden. Die Fixationslösung wurde 10 Minuten in den Näpfen belassen.

Die Vitalschnitte wurden durch Umsetzen der Siebeinsätze dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Beim letzten Waschvorgang wurde PBS in Kombination mit Nitrobluetetrazolium verwendet, um eine weitere licht- oder wärmebedingte Radikalbildung in den Vitalschnitten zu vermeiden.

Die Vitalschnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgezogen und mit gepuffertem Glycerol eingedeckelt. Die Objektträger wurden bis zur Messung im Dunkeln und auf Eis gelagert.

3.2.2.3.2 Positivkontrolle zur Messung einer erhöhten intrazellulären ROS-Produktion mit DCFH-DA

In weiteren Versuchen wurden als Positivkontrollen zur intrazellulären ROS-Messung mit DCF-DA Rotenon in einer Konzentration von 20 µM und PMA in einer Konzentration von 1,8 µM eingesetzt. Bei Rotenon handelt es sich um einen Atmungsketteninhibitor; PMA ist ein Stimulator der NADPH-Oxidase. Beide Substanzen führen auf unterschiedlichen Wegen zu einer Erhöhung der ROS-Konzentration (Kummer et al., 1999, 2000; Chandel et al., 2000). Die Messbarkeit dieser erhöhten ROS-Konzentration sollte kontrolliert werden. Die Vitalschnitte wurden dazu ausschließlich unter normoxischen Bedingungen mit DCFH-DA (1 µM) und wahlweise entweder mit Rotenon oder mit PMA inkubiert. Die Art und Weise der

Inkubation, der Fixation und des Eindeckelns erfolgte genauso, wie unter Punkt 3.2.2.3.1 beschrieben.

3.2.2.3.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die Auswertung der Objektträger am CLSM erfolgte ähnlich wie bei den Spinalganglienneuronen in Punkt 1.3.4. Es wurden das 40er Objektiv und der 2er Zoom benutzt. Die Messungen erfolgten im konfokalen Modus bei einer Scanzeit von 32 Sekunden. Die Laserwellenlänge betrug 488 nm. Wie bei den Spinalganglienneuronen musste vor der Messung die Empfindlichkeitseinstellung des Gerätes zur Bestimmung geeigneter Kontrast- und Helligkeitswerte erfolgen. Dazu wurde aus jeder Versuchsbedingung (Hypoxie, Normoxie, Rotenon, PMA) jeweils ein Objektträger einmal probegescannt. Dabei konnten durch die Veränderung von Kontrast und Helligkeit geeignete Werte gefunden werden, um die Auswertung aller anderen Objektträger mit ihren verschiedenen Fluoreszenzintensitäten zu ermöglichen.

3.2.2.3.4 Messvorgang

Die Objektträger wurden kodiert und als Blindversuch ausgewertet. Alle Objektträger wurden mit denselben durch das Probescanning gefundenen Kontrast- und Helligkeitswerten durchgescannt. Pro Gesichtsfeld wurden bis zu 10 Zellen gemessen. Die Umrisse der Zellen wurden auf dem Bildschirm umfahren und die Fluoreszenzintensität über die Computersoftware bestimmt. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde in Grauwerten auf einer Skala von 0 bis 255 wiedergegeben.

3.2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte unter Verwendung des Statistikprogrammes SPSS 9.0. Für jeden einzelnen Versuchstag wurden die Daten der verschiedenen Versuchsgruppen einer explorativen Datenanalyse unterzogen und die Gruppen mit den nicht-parametrischen Tests nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney

untereinander verglichen. Nachfolgend wurden die von einem Versuchstag stammenden Medianwerte einer Versuchsgruppe als jeweils einzelner Datenpunkt in eine neue Datentabelle übertragen. Die Daten eines individuellen Versuchstages wurden dabei als voneinander abhängig betrachtet. Die Analyse dieser Daten erfolgte einerseits mit den nicht-parametrischen Tests für abhängige Stichproben nach Friedman und Wilcoxon. Weiterhin erfolgte für jeden Versuchstag durch Quotientenbildung eine Normierung der Mittelwerte einer jeden Versuchsgruppe zum Bezugspunkt der normoxischen, unbehandelten Gruppe, deren Wert damit als 1 gesetzt wurde. Diese standardisierten Werte wurden nachfolgend den Tests nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney unterzogen. Unterschiede wurden als signifikant bei $p \leq 0,05$ eingestuft.

4 Ergebnisse

4.1 Dissoziierte Spinalganglienneurone

Der Versuch der Kultivierung dissoziierter Spinalganglienneurone ergab eine sehr geringe Ausbeute an auf den Objektträgern haften gebliebenen lebenden Zellen. Die Inkubation mit den Fluoreszenzindikatoren DCFH-DA und Dihydrorhodamin führte zu einer Ablösung der Zellen von den Objektträgern. Die Anzahl der auf den Objektträgern verbliebenen Zellen war so gering, dass eine statistische Auswertung der Messergebnisse nicht möglich war. Zudem war bei DCFH-DA eine für diesen Fluoreszenzindikator typische Aufhellung der mikroskopierten Zellen festzustellen. Diese Aufhellung findet ihre Ursache in den beim Mikroskopiervorgang lichtbedingt entstehenden Radikalen. Eine einheitliche Einstellung der Kontrast- und Helligkeitswerte konnte deshalb nicht durchgeführt werden. Um den Aufhellungseffekt zu verhindern, wurde in späteren Versuchen bei den vitalen Spinalganglienschnitten Nitrobluetetrazolium eingesetzt (siehe 3.2.2.3.1).

Insgesamt wurde dazu übergangen, Vitalschnitte aus den DRGs der Ratte herzustellen, um zum einen die Anzahl der Zellen für die Messungen zu erhöhen, zum anderen aber auch um die Vitalität der Zellen aufgrund der wesentlich kürzeren Versuchszeit zu gewährleisten.

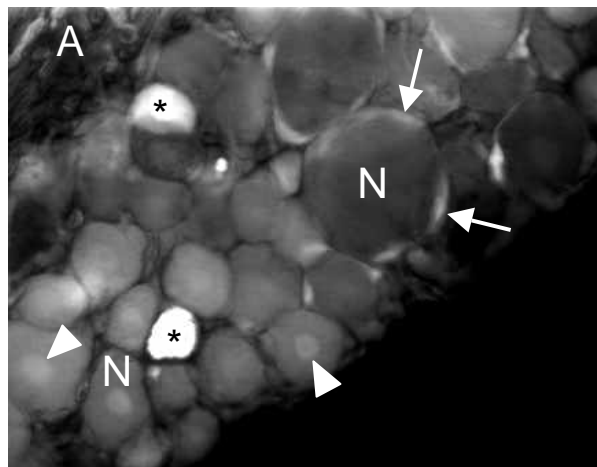
4.2 Vitale Spinalganglienschnitte

4.2.1 Mikroskopische Beschreibung des Fluoreszenzbildes bei Normoxie (20 % O₂)

Mit dem CLSM wurde die DCF-Fluoreszenz in Neuronen der vorher in vitro inkubierten lumbalen Spinalganglienschnitte ausgewertet. Es wurde der konfokale Modus des Mikroskopes gewählt. Der konfokale Modus ermöglicht das Mikroskopieren einer einzelnen Zellschicht innerhalb eines Gewebeverbandes, bei dem es sich um eine Überlagerung mehrerer Zellschichten handelt. Mit dem nicht-konfokalen Modus ist es nicht möglich, einzelne Ebenen aus dem Schnitt im mikroskopischen Bild

darzustellen. Der konfokale Modus des CLSM ist für Gewebsschnitte gut geeignet und ermöglicht eine exakte Darstellung einzelner Neurone.

In den Neuronen zeigte sich eine inhomogene Verteilung des Fluoreszenzindikators DCF: Der Nukleus wies im Gegensatz zum Zytoplasma der Neurone häufig eine höhere Fluoreszenzintensität auf. Auch die um die Neurone gelagerten Satellitenzellen fluoreszierten teilweise heller. Einzelne Neurone leuchteten mit einer höheren Fluoreszenzintensität als die Mehrheit der anderen Neurone (Abb. 3).



- | |
|--|
| A = Axone |
| N = Neurone |
| * = einzelne heller fluoreszierende Neurone |
| ▶ = Zellkerne der Neurone |
| → = Satellitenzellen |

Abb. 3: Darstellung der intrazellulären ROS-Bildung in Neuronen in vitalen Ganglienschnitten mit DCFH-DA.

4.2.2 Inkubation der Vitalschnitte mit Rotenon

In 5 Versuchen wurde der Atmungsketteninhibitor Rotenon eingesetzt. Unter Normoxie konnte ein signifikanter Anstieg der ROS-Bildung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden. Die mit Rotenon behandelten Neurone wiesen eine höhere Fluoreszenzintensität als die unbehandelten Neurone auf. (Abb. 4, 5, 6).

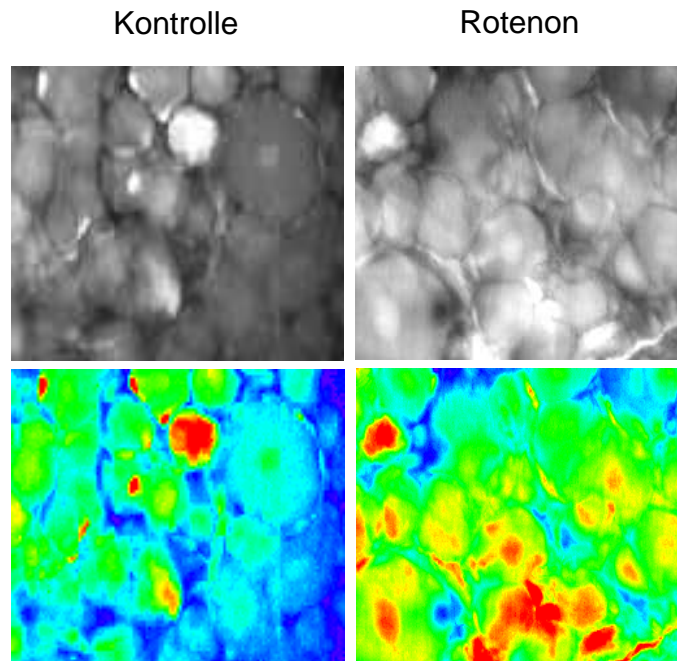


Abb. 4: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei Neuronen in vitalen Ganglienschnitten nach einstündiger Inkubation mit Rotenon. Die Fluoreszenzintensität wird in Graustufen wiedergegeben, die in Fehlfarben konvertiert wurden. Eine hohe Fluoreszenzintensität ist durch rote, eine niedrige durch blaue Farbe gekennzeichnet.

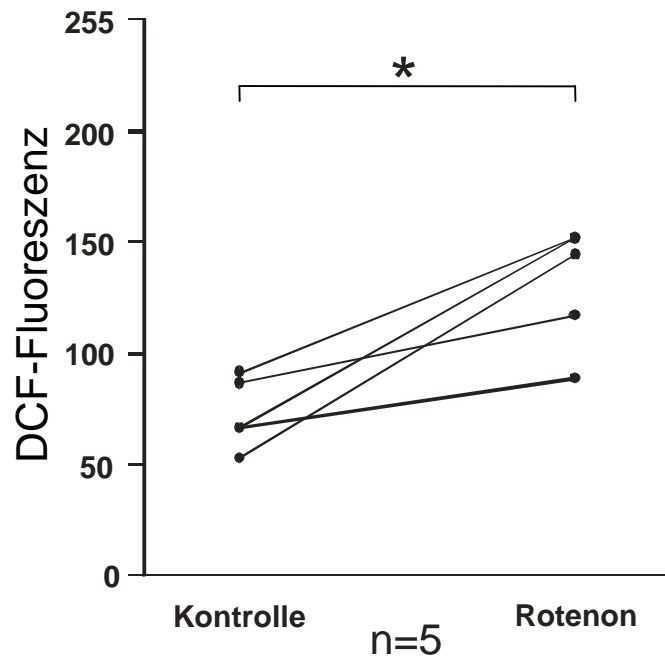


Abb. 5: Grauwert-kodierte intrazelluläre DCF-Fluoreszenz von Neuronen nach einstündiger Inkubation mit Rotenon unter Normoxie (20% O₂). Die Punkte geben die ermittelten Mittelwerte eines Versuchstages wieder. Die Messwerte eines Versuchstages sind miteinander verbunden. (* $p = 0,017$).

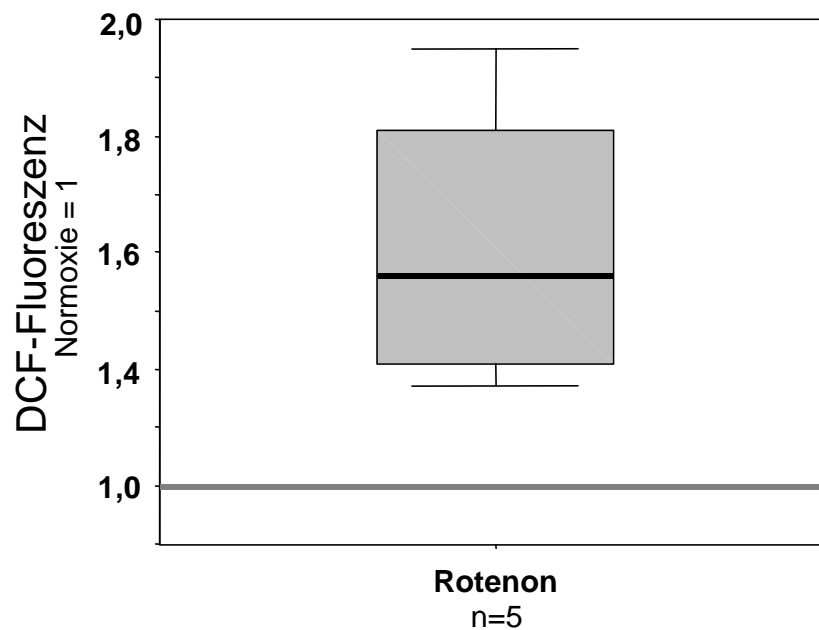


Abb. 6: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz von Neuronen nach einstündiger Inkubation mit Rotenon unter Normoxie. Darstellung nach Standardisierung auf Normoxie=1.

4.2.3 Inkubation der Vitalschnitte mit PMA

Nach Zugabe des Proteinkinase C Aktivators PMA konnte in insgesamt 8 Versuchen ein signifikanter Anstieg der ROS-Bildung unter Normoxie im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden, der sich wie bei den mit Rotenon behandelten Neuronen in einer höheren Fluoreszenzintensität der Neurone äusserte (Abb. 7, 8, 9).

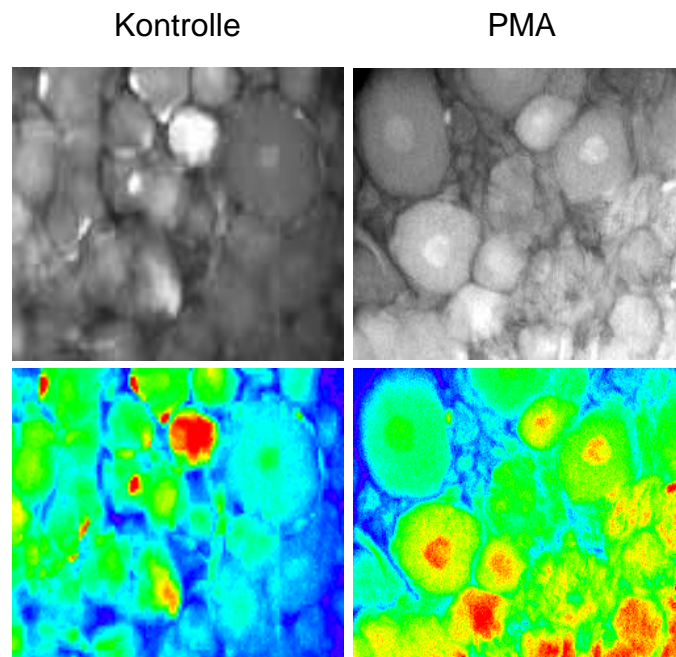


Abb. 7: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei Neuronen in vitalen Ganglienschnitten nach einstündiger Inkubation mit PMA unter Normoxie. Die Fluoreszenzintensität wird in Graustufen wiedergegeben, die in Fehlfarben konvertiert wurden. Eine hohe Fluoreszenzintensität ist durch rote, eine niedrige durch blaue Farbe gekennzeichnet.

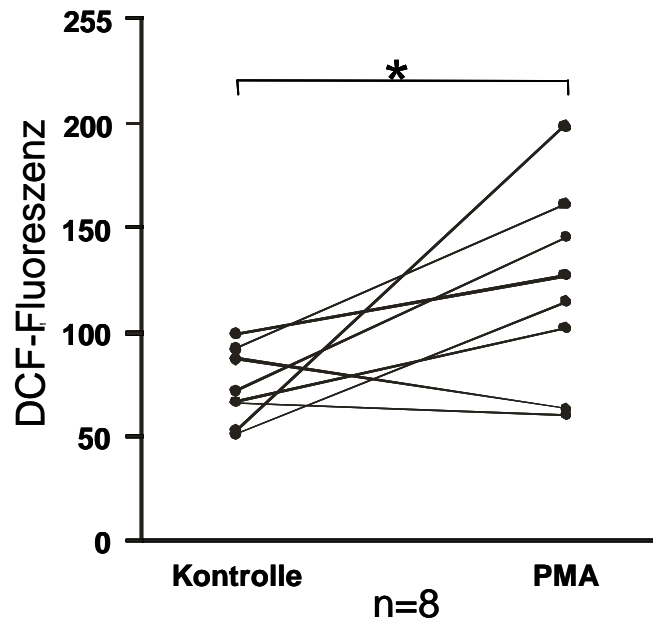


Abb. 8: Grauwert-kodierte intrazelluläre DCF-Fluoreszenz von Neuronen nach einstündiger Inkubation mit PMA unter Normoxie (20% O₂). Die Punkte geben die ermittelten Mittelwerte eines Versuchstages wieder. Die Messwerte eines Versuchstages sind miteinander verbunden (* $p = 0,032$).

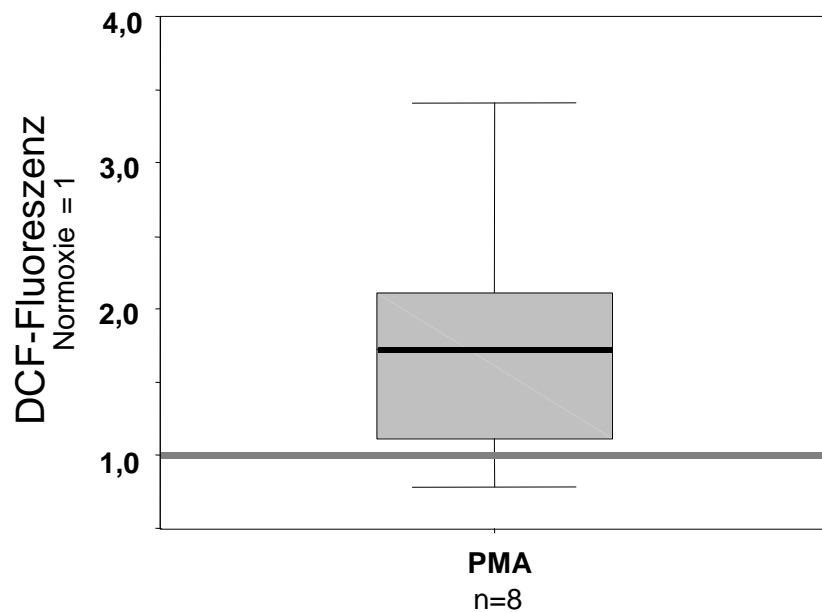


Abb. 9: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz von Neuronen nach einstündiger Inkubation mit PMA unter Normoxie. Darstellung nach Standardisierung auf Normoxie=1.

4.2.4 Inkubation der Vitalschnitte unter Normoxie und Hypoxie

In insgesamt 16 Versuchen wurde die Fluoreszenzintensität von Neuronen in vitalen Spinalganglienschnitten nach Inkubation mit DCFH-DA unter Normoxie und Hypoxie verglichen. An einigen Versuchstagen wurden unter Hypoxie erhöhte Fluoreszenzwerte gemessen (Abb. 10), an anderen Versuchstagen wurden unter Normoxie erhöhte Fluoreszenzwerte gemessen (Abb. 11). Ebenfalls konnten aber auch nahezu äquivalente Fluoreszenzwerte unter Hypoxie und Normoxie beobachtet werden (Abb. 12). Nach Ermittlung der Fluoreszenzmittelwerte der Neuronen an den einzelnen Versuchstagen unter Hypoxie und Normoxie und der statistischer Auswertung aller 16 Versuchstage konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie festgestellt werden (Abb. 13, 14, 15).

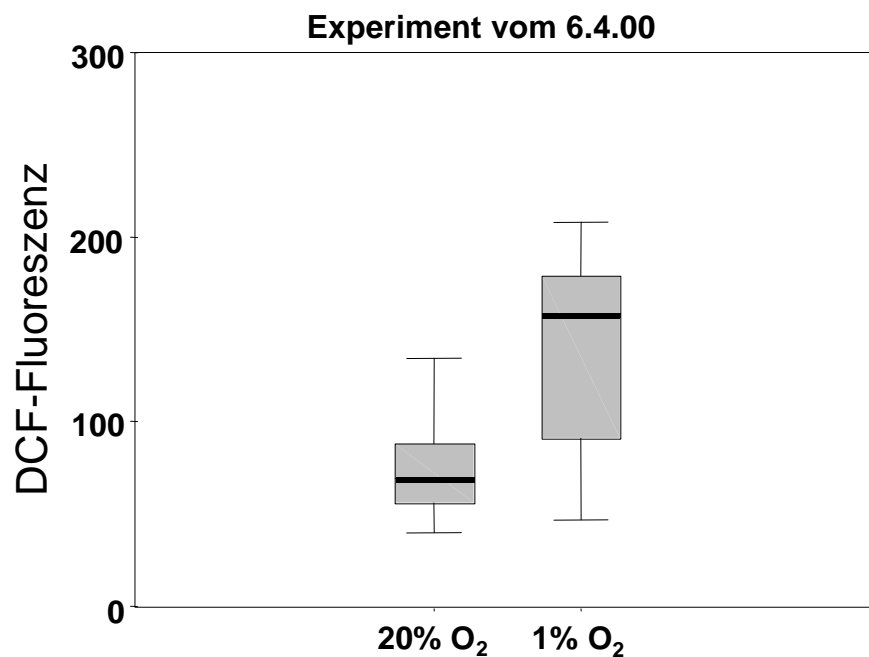


Abb. 10: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz von Neuronen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) an einem Versuchstag mit erhöhten Fluoreszenzwerten unter Hypoxie. Es wurden jeweils 30 Zellen gemessen.

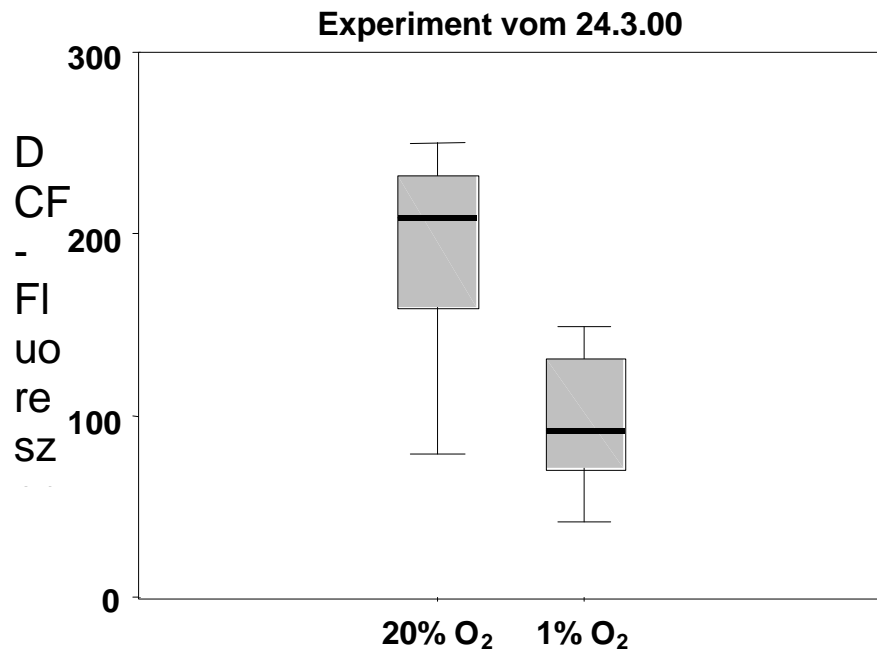


Abb. 11: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz von Neuronen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) an einem Versuchstag mit erhöhten Fluoreszenzwerten unter Normoxie. Es wurden jeweils 30 Zellen gemessen.

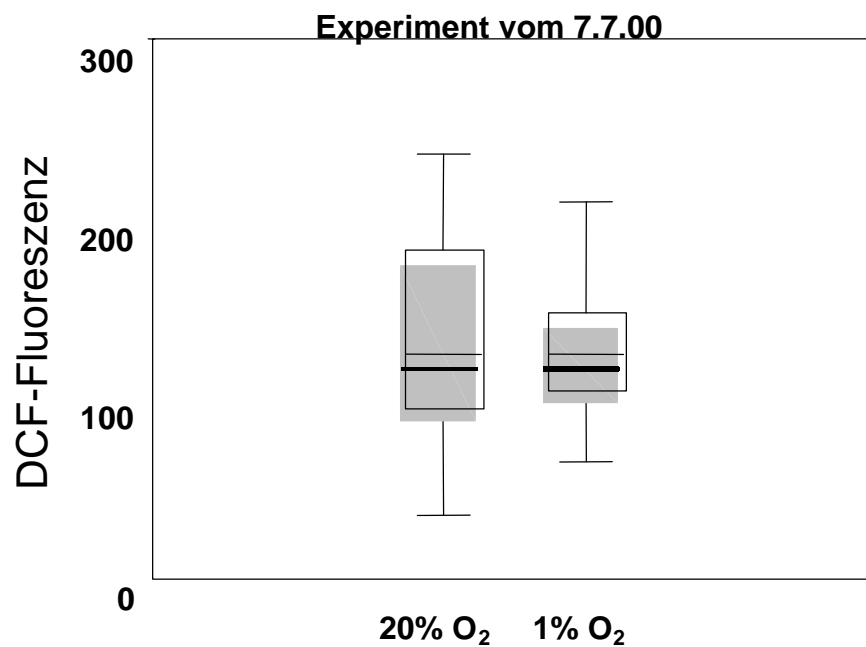


Abb. 12: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz von Neuronen nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) an einem Versuchstag mit nahezu äquivalenten Fluoreszenzwerten unter Hypoxie und Normoxie. Es wurden jeweils 35 Zellen gemessen.

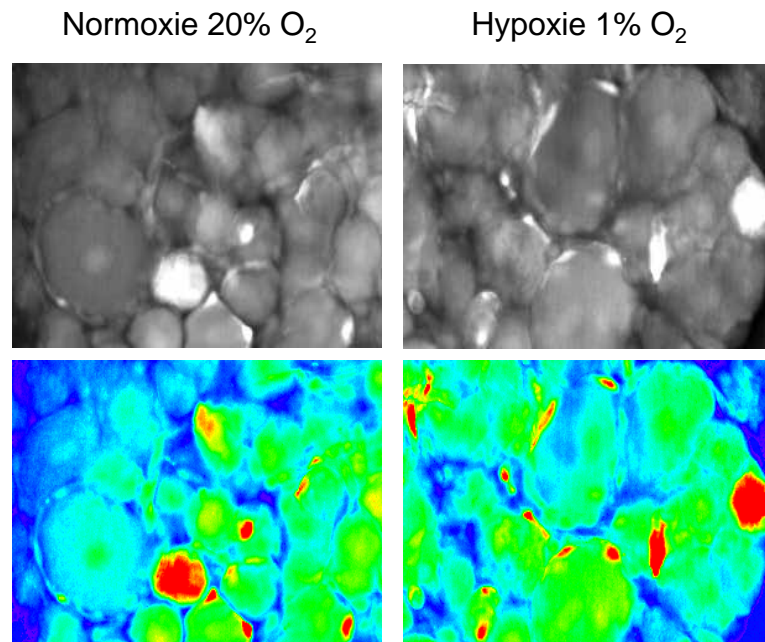


Abb. 13: Grauwert-kodierte intrazelluläre ROS-Bildung bei Neuronen in vitalen Ganglienschnitten nach einstündiger Normoxie bzw. Hypoxie. Die Fluoreszenzintensität wird in Graustufen wiedergegeben, die in Fehlfarben konvertiert wurden. Eine hohe Fluoreszenzintensität ist durch rote, eine niedrige durch blaue Farbe gekennzeichnet.

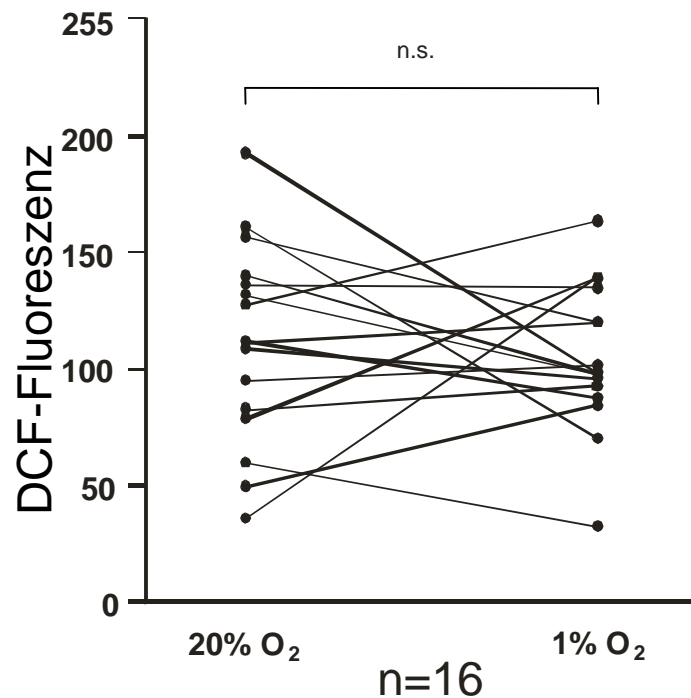


Abb. 14: Grauwert-kodierte intrazelluläre DCF-Fluoreszenz nach einstündiger Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) von Neuronen. Die Punkte geben die ermittelten Mittelwerte eines Versuchstages wieder (n.s. = nicht signifikant, $p = 0,925$)

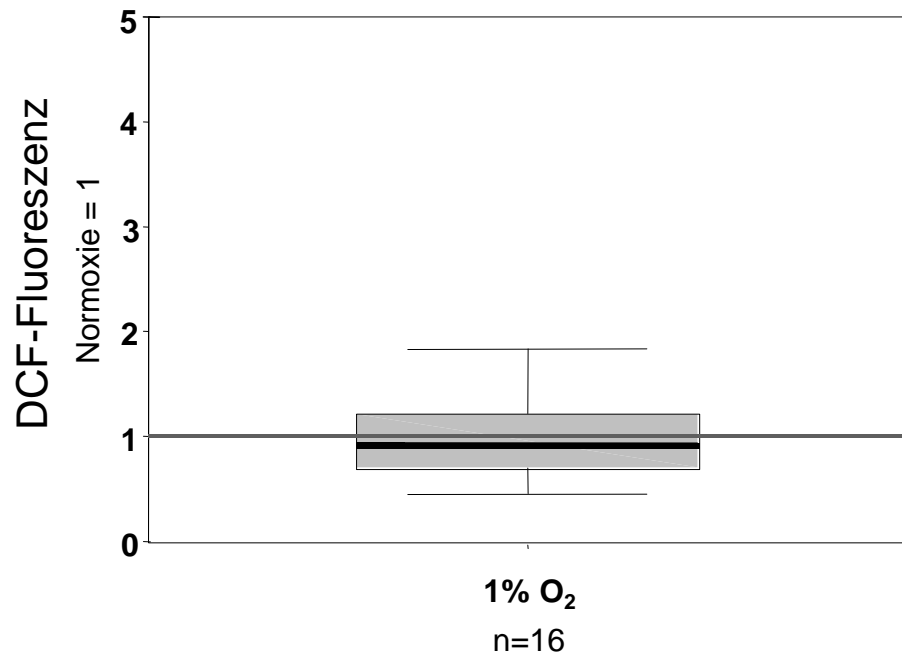


Abb. 15: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz von Neuronen nach einstündiger Normoxie und Hypoxie. Darstellung nach Standardisierung auf Normoxie=1.

4.2.5 Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsbedingungen untereinander

Der Vergleich der drei unterschiedlichen Stimulationsbedingungen untereinander zeigt eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz der unter Normoxie mit PMA und Rotenon inkubierten Neuronen gegenüber den unbehandelten Neuronen unter Hypoxie.

Die mit PMA und Rotenon behandelten Neurone wiesen eine ähnlich starke Fluoreszenz auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es unter Hypoxie im Vergleich zu den normoxisch inkubierten Zellen zu keinem signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität kam, während die mit PMA und Rotenon behandelten Neurone einen signifikanten Anstieg ihrer Fluoreszenzintensität sowohl gegenüber den normoxisch inkubierten als auch gegenüber den hypoxisch inkubierten Neuronen aufwiesen (Abb. 16).

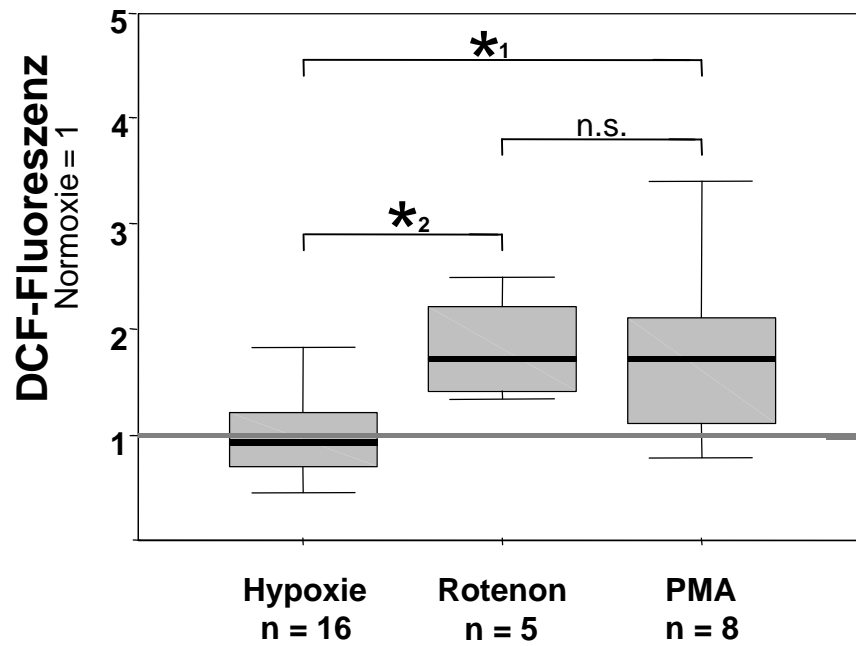


Abb. 16: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentile der Grauwert-kodierten intrazellulären DCF-Fluoreszenz von Neuronen nach einstündiger Inkubation mit Rotenon und PMA unter Normoxie. Darstellung nach Standardisierung auf Normoxie=1 (*₁, $p=0,032$; *₂ $p=0,015$; n.s. $p=0,622$).

5 Diskussion

5.1 Methodische Aspekte

ROS sind äusserst reaktionsfähige Sauerstoffverbindungen. Ursprünglich wurde angenommen, dass ROS ausschliesslich als toxische Nebenprodukte des Zellstoffwechsels gebildet werden und im sogenannten „oxidativen Stress“ für die Zerstörung von zelleigenen Strukturen verantwortlich sind. Inzwischen wird den ROS aber eine wichtige physiologische Funktion in verschiedenen Signaltransduktionswegen der Zelle zugeschrieben (Finkel, 1998; Rhee, 1999; Ulrich und Bachschmid, 2000; Thannikal et al., 2000). Eine besonders wichtige Rolle spielen die ROS bei den zellulären Reaktionen auf Hypoxie, da sie als second messenger am Sauerstoffsensormechanismus der Zelle beteiligt zu sein scheinen (Duranteau et al., 1998; Semenza, 1999; Chandel und Schumacker, 2000).

Die vorliegende Arbeit sollte die Frage klären, ob Hypoxie die ROS-Produktion in primär afferenten Neuronen der Ratte beeinflusst, und somit zum Verständnis des Mechanismus des neuronalen Sauerstoffsensormechanismus beitragen.

5.1.1 Verwendung neuronaler Zellen

Auch andere Arbeitsgruppen haben in der Vergangenheit die zelluläre ROS-Produktion unter Hypoxie untersucht. Die bislang durchgeführten Studien fanden an einer Reihe isolierter Zelltypen hauptsächlich nicht-neuronaler Herkunft statt. So wurde die ROS-Produktion unter Hypoxie an den Hepatomzelllinien Hep3B und HepG2 sowie an Herzmuskelzellen (Chandel et al., 1998 und Duranteau et al., 1998) untersucht. Studien an Zellen neuronaler Herkunft wurden an der Phäochromocytomzelllinie (PC12-Zellen) aus dem Nebennierenmark der Ratte durchgeführt (Kroll und Czyzyk-Krzeska, 1998; Höhler et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde die ROS-Produktion unter Hypoxie zum ersten Mal an Zellen neuronaler Herkunft aus einem intakten, lebenden Gewebsverband untersucht. Die Auswirkung von Hypoxie auf Neurone ist besonders bedeutend, weil diese im Gegensatz zu Zellen aus anderen Gewebeverbänden auch auf kurze Hypoxieperioden

sehr sensibel reagieren. Eine der ersten Reaktionen auf Hypoxie ist die verstärkte Ausschüttung von Transmittern (Fleiderovich, 2001). Um den nicht durch Synapsen vermittelten Einfluss von Hypoxie auf die neuronale ROS-Produktion zu analysieren und eine mögliche Überlagerung der Messergebnisse durch ausgeschüttete Transmitter zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit die Spinalganglien der Ratte (DRG) für die Versuche ausgewählt, da in ihnen keine synaptische Umschaltung erfolgt.

5.1.2 Verwendung von Vitalschnitten

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde versucht, Neurone aus den dissoziierten DRGs der Ratte in Objektträgerzellkultur zu bringen. Anschließend sollte die ROS-Produktion durch die Zugabe verschiedener Fluoreszenzindikatoren untersucht werden. Bei der Dissoziation werden die neuronalen Zellen durch Behandlung mit Trypsin und durch mehrere Zentrifugationsprozesse vereinzelt, um eine Monolayerschicht auf Objektträgern kultivieren zu können. Neuronale Zellen sind für diesen Zweck aber nur bedingt geeignet:

Die Ausbeute der auf den Objektträgern haften gebliebenen, lebenden Zellen ist nach der Dissoziation ohnehin schon gering. Außerdem vermehren sich die neuronalen Zellen im Gegensatz zu anderen Zellarten nicht, sodass nur an den wenigen vorhandenen, durch die Dissoziation schon vorgeschädigten Zellen, Messungen durchgeführt werden können. Die Zugabe der Fluoreszenzindikatoren DCFH-DA und H₂R zum Nachweis der ROS führte zusätzlich zu einer Ablösung der Zellen von den Objektträgern. Die Anzahl der auf den Objektträgern anschließend noch haften gebliebenen Zellen war so gering, dass eine statistische Auswertung der Ergebnisse nicht möglich war.

Deshalb wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die ROS-Produktion unter Hypoxie an neuronalen Zellen aus einem intakten, lebenden Gewebsverband untersucht. Zu diesem Zweck wurden aus den Spinalganglien der Ratte mittels eines Vibratoms Vitalschnitte hergestellt. Die Messung von ROS in Vitalschnitten stellt eine technische Neuerung dar, weil bislang ausschließlich Zellkulturen verwendet wurden, um die ROS-Produktion unter Hypoxie zu untersuchen. Bei dieser Methode stehen erheblich mehr Zellen für einen Messvorgang zur Verfügung, da der komplette Querschnitt eines Spinalganglions

mikroskopiert werden kann. Außerdem kommt es durch die Herstellung von Vitalschnitten nur zu einer geringen Vorschädigung der Neuronen, da die Zellen nicht dissoziiert und isoliert werden müssen. Die an der Schnittoberfläche gelegenen und durch den Schneidevorgang verletzten Zellen werden bei der Messung von zentral gelegenen Ebenen im konfokalen Modus nicht erfasst. Die Messung von ROS in Vitalschnitten stellt daher sicher, dass die Zellen ähnlich dem Zustand *in vivo* weiter in Interaktion bleiben können. Die Zellen verbleiben in ihrem natürlichen Gewebeverband, sodass die Reaktionen der Zellen auf Hypoxie möglichst naturgetreu untersucht werden können. Auch in nachfolgenden Untersuchungen an primär afferenten Neuronen des Ganglion nodosum (Yamamoto et al., 2003) und an Lungengefäßen (Paddenberg et al., 2003) wurde die in der vorliegenden Arbeit angewandte Technik erfolgreich durchgeführt.

5.1.3 Detektion der Fluoreszenzindikatoren mittels Laserscanning-Mikroskopie

Es gibt verschiedene Techniken zur Messung der ROS-Konzentration. Eine exakte Quantifizierung erlauben die Bestimmung der Cytochrom C-Reduktion und Elektronen-Spin-Resonanz. Diese Methodiken erlauben aber keine Differenzierung zwischen extra- und intrazellulären ROS. Die Fluoreszenzindikatoren DCFH-DA und H₂R sind hingegen nicht geeignet, zwischen verschiedenen ROS-Spezies zu differenzieren und exakte Konzentrationsangaben zu liefern, sind aber dennoch die Methodik der Wahl, um die intrazelluläre ROS-Produktion darzustellen und Vergleiche in der relativen intrazellulären ROS-Produktion unter verschiedenen Versuchsbedingungen durchzuführen. DCFH-DA und H₂R sind in der Lage die Zellmembran zu penetrieren und signifikante intrazelluläre Konzentrationen zu erreichen. Zudem weisen sie eine minimale zelluläre Toxizität auf. (Royall und Ischiropoulos, 1993). Intrazellulär gebildete ROS (v.a. H₂O₂) oxidieren die beiden farblosen Substanzen zu ihren fluoreszierenden Metaboliten DCF und Rhodamin 123 (Cathcart et al., 1983; Bass et al., 1983; Rothe et al., 1988; Royall und Ischiropoulos, 1993; Carter et al., 1994; Dugan et al., 1995; Crow, 1997). Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der intrazellulären H₂O₂-Konzentration (Royall und Ischiropoulos, 1993; Chandel und Schumacker, 2000).

Die Fluoreszenz der Zellen durch DCF und Rhodamin 123 kann mit unterschiedlichen Verfahren gemessen werden. Eine Möglichkeit ist z.B. die Spektrofluorometrie (Kroll und Czyzyk-Krzeska, 1998; Chandel et al., 2000), eine andere die an eine digitale Kamera gekoppelte Umkehrfluoreszenzmikroskopie (Vanden Hoek, 1998; Chandel et al., 1998).

Die in dieser Arbeit angewandte Technik der Laserscanning-Mikroskopie wurde zum ersten Mal von Kummer und Acker (1997) angewendet, um die Bildung von ROS in SIF-Zellen (small intensely fluorescent) aus dem oberen Zervikalganglion weniger Tage alter Ratten darzustellen. Verfeinert wurde diese Methode durch Höhler et al. (1999), die bei der Untersuchung der Auswirkung von Hypoxie auf PC12-Zellen die ROS-Konzentration mittels der Fluoreszenzindikatoren DCFH-DA und H₂R und der LSM messen konnten. Die LSM zur Messung der ROS-Konzentration in Neuronen bietet gegenüber anderen Methoden entscheidende Vorteile:

1. Sie bietet die Möglichkeit, die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen zu messen. Dabei können Neurone von anderen Zellen, wie z.B. Satellitenzellen, unterschieden werden.
2. Der konfokale Modus des LSM ermöglicht zudem das Mikroskopieren einer einzelnen Zellschicht innerhalb eines Gewebeverbandes.

Die LSM von Vitalschnitten der DRGs der Ratte bietet somit eine adäquate Möglichkeit, die ROS-Produktion einzelner Neurone innerhalb eines Zellverbandes darzustellen.

Weiterhin wurde die in dieser Arbeit angewandte Messtechnik an Vitalschnitten in einer parallel in der gleichen Arbeitsgruppe laufenden Untersuchung von Henrich et al. (2000) mit Erfolg zur Messung von NO verwendet. Die Methodik unterschied sich einzig durch die Verwendung eines anderen Fluoreszenzindikators (DAF-2DA = 4,5-Diaminofluoreszein-2-Diazetat) sowie die durch den Fluoreszenzindikator bedingten längeren Inkubationszeit. Ebenso wie in dieser Arbeit wurden die Messungen an Vitalschnitten aus den Neuronen der DRGs der Ratte und LSM durchgeführt. Die Neurone aus der Schnittkultur reagierten mit einer vermehrten NO-Produktion unter Hypoxie.

5.1.4 Verwendung von Nitrobluetetrazolium

Vor der Messung der Fluoreszenzintensität in den Vitalschnitten mittels des LSM waren mehrere Probescans eines Objektträgers aus jeder Versuchsbedingung notwendig. Damit wurden geeignete Kontrast- und Helligkeitswerte bestimmt, mit denen die restlichen Objektträger gemessen werden konnten. Bei diesen Probescans fiel auf, dass es beim mehrfachen Scan eines Objektträgers zu einer starken licht- und wärmebedingten Aufhellung der Zellen kam, die eine Empfindlichkeitseinstellung des LSM zur Messung der restlichen Objektträger unmöglich machte.

Deshalb wurde als weitere technische Neuerung in den folgenden Messungen Nitrobluetetrazolium (NBT) eingesetzt. NBT ist ein gelber Farbstoff, der durch ROS zu Diformazan reduziert wird. NBT wurde ursprünglich als Marker für die Produktion von ROS in und von Zellen eingesetzt (DiGregorio et al., 1987; Strasser et al., 1997). Der Metabolit Diformazan bildet einen bläulich-schwarzen Niederschlag, der lichtmikroskopisch nachgewiesen und mit verschiedenen Methoden gemessen werden kann. In dieser Arbeit diente NBT als Oxidationsmittel für die während der CLSM-Untersuchung generierten ROS. Die auf Objektträger aufgezogenen Vitalschnitte wurden vor der Messung am LSM mit einer PBS-NBT-Lösung gewaschen. Die ROS, welche durch das Licht und die Wärme des Mikroskopes entstanden (Afzal et al., 2003), wurden durch NBT oxidiert, sodass sie nicht mit den beiden Fluoreszenzindikatoren DCFH-DA und H₂R reagieren konnten. Auch nach mehrmaligem Scan kam es nur noch zu einer leichten Aufhellung der Zellen, sodass eine Empfindlichkeitseinstellung des LSM gefunden wurde, um die restlichen Vitalschnitte zu messen. Diese verbleibende Fluoreszenzzunahme auch unter NBT-Zugabe ist wahrscheinlich auf ein zusätzliches, noch nicht molekular identifiziertes Fotooxidationsprodukt von DCFH zurückzuführen (Afzal et al., 2003). Beim Messvorgang wurde zudem darauf geachtet, jeden Objektträger nur einmal zu scannen. So konnte sichergestellt werden, dass nur diejenigen ROS gemessen wurden, die tatsächlich auch während der Inkubationszeit unter Hypoxie bzw. Normoxie entstanden waren. Diese Methodik bietet einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Methoden, bei denen die durch Licht und Wärme entstandenen ROS zwangsläufig mitgemessen werden.

5.2 Regulation der ROS-Produktion in primär afferenten Neuronen

5.2.1 PMA

PMA ist ein hochpotenter Tumorpromoter für Hauttumoren bei der Maus (Furstenberger et al., 1981) und ein Aktivator der PKC, einem Enzym, das unter anderem die Proteine der NADPH-Oxidase phosphoryliert (Niedel et al., 1983). Die NADPH-Oxidase ist ein Bestandteil der Pathogenabwehr neutrophiler Granulozyten. Die von ihr gebildeten ROS töten im sogenannten „respiratory burst“ pathogene Mikroorganismen ab (Heinecke et al., 1990; Regier et al., 2000). Die PMA-induzierte Stimulation der NADPH-Oxidase besteht im Ergebnis aus verschiedenen Interaktionen zwischen den zytosolischen Aktivierungsfaktoren p47phox und p67phox, dem membrangebundenen Cytochrom b₅₈₈ und der PKC (William et al., 1991):

Die Stimulation der NADPH-Oxidase durch PMA beginnt mit einer Phosphorylierung der zytosolischen Aktivierungsfaktoren p47phox und p67phox. Diese Phosphorylierung führt zu einer Translokation von p47phox und p67phox aus dem Zytosol in die Plasmamembran (Nausee et al., 1991; Dusi und Rossi, 1993; Benna et al., 1997). Die Phosphorylierung von p47phox ist PKC abhängig (Benna et al., 1997; Regier et al., 2000), während die Phosphorylierung von p67phox durch PKC-abhängige und -unabhängige Mechanismen reguliert werden kann (Benna et al., 1997). Bei der Stimulation der NADPH-Oxidase durch PMA konnte auch eine Reduktion des Cytochroms b₅₅₈ beobachtet werden (Sijtsema et al., 2000). PMA induziert die Phosphorylierung von p22phox, einer Untereinheit des Cytochroms b₅₅₈. Diese Phosphorylierung wird entweder durch die PKC selbst, oder durch eine ihrer zahlreichen Isoformen katalysiert, und führt ebenfalls zu einer Stimulation der NADPH-Oxidase und zu einer damit verbundenen ROS-Bildung (Regier et al., 2000).

Verschiedene Subtypen der aus mehreren Proteinkomponenten bestehenden NADPH-Oxidase konnten aber auch in nicht-phagozytierenden Zellen nachgewiesen werden (Thannikal und Fanburg, 1995; Jones et al., 1995; Fukui et al., 1995), so auch in neuronalen Zellen (Dvorakova et al., 1999; Tammariello et al., 2000). Auch in neuronalen Zellen katalysiert die PKC die Phosphorylierung der Proteine der NADPH-Oxidase. Diese reagiert darauf mit der Produktion von ROS. Die PKC kann auch in

kultivierten kortikalen Neuronen durch PMA stimuliert werden und dort zu einer erhöhten ROS-Produktion führen (Noh und Koh, 2000).

Die Stimulation durch PMA kann nur in lebenden Zellen zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS führen, da bei diesem Vorgang das intakte NADPH-Oxidasesystem der Zelle benötigt wird. Auch in dieser Arbeit konnte durch PMA ein signifikanter Anstieg der ROS-Bildung unter Normoxie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden. Entsprechend wird auch in primär afferenten Neuronen über einen PKC-abhängigen Mechanismus die ROS-Produktion gesteigert. Dieser Mechanismus schließt wahrscheinlich eine NADPH-Oxidase ein, wie sie bereits auf mRNA- und Proteinebene von Dvorakova et al. (1999) in DRG-Neuronen der Ratte nachgewiesen wurde.

5.2.2 Rotenon

Rotenon ist ein Kontaktinsektizid und wird aus den Wurzeln von bestimmten, in tropischen Regionen heimischen Leguminosenarten gewonnen (*Derris* ssp., *Lonchocarpus* ssp., *Terphrosia* spp.) (Lindahl und Öberg, 1961). Rotenon greift in die Atmungskette ein und unterbricht die mitochondriale Elektronentransportkette an Komplex I (auch NADH-Dehydrogenase) (Genova et al., 1997; Seaton et al., 1997; Higuchi et al., 1998). Die mitochondriale Atmungskette ist ein Multienzymssystem lebender Zellen, das hintereinandergeschaltete Redoxsysteme katalysiert, welche durch Wasserstoff- und Elektronenübertragung Substrat-H₂ zu Wasser oxidieren. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form von ATP gespeichert. Der Komplex I des Multienzymkomplexes der Atmungskette katalysiert dabei den in Stufen ablaufenden Elektronentransport von NADH zum Ubiquinon über Eisen-Schwefel-Cluster. Rotenon inhibiert den Elektronentransfer zwischen den Eisen-Schwefel-Clustern und Ubichinon (Palmer et al., 1968). Der lipophile Hemmstoff (Marey-Semper et al., 1993) reagiert mit der hydrophoben (Genova et al., 1997) ND 1 Proteinuntereinheit der NADH-Dehydrogenase, einem 33 kD Protein (Earley et al., 1987). Die Hemmung des Elektronentransfers zwischen den Eisen-Schwefel-Clustern und dem Ubiquinon führt zu einer Reduktion aller Eisen-Schwefel-Cluster (Palmer et al., 1968) und zu einer Blockade der Rückoxidation von NADH zu NAD⁺ (Lindahl und Öberg, 1961). In

diesem reduzierten Zustand transferiert die NADH-Dehydrogenase die Elektronen direkt auf molekularen Sauerstoff, was zu einer gesteigerten $O_2^{\cdot-}$ -Bildung führt (Turrens und Boveris, 1980). Henseley et al. (1998) konnten an isolierten Gehirnmitochondrien gleichzeitig eine Blockade der NADH-Oxidation und eine gesteigerte NADH-gekoppelte H_2O_2 -Produktion durch Rotenon feststellen. Sie folgerten daraus, dass die H_2O_2 -Synthese in den Gehirnmitochondrien an Komplex I der mitochondrialen Atmungskette stattfindet. Die Elektronen verlassen dabei die Elektronentransportkette noch vor der Rotenonbindungsstelle über ein „Elektronenleck“ und bilden in Verbindung mit O_2 ROS.

Rotenon führte bei unterschiedlichen Zelltypen sowohl zu einer Erhöhung als auch zu einer Verminderung der intrazellulären Konzentration mitochondrialer ROS:

Die Arbeitsgruppe von Barrientos und Moraes (1999) stellte bei Experimenten an einer humanen Osteosarkom-Zelllinie nach Rotenon-Behandlung eine erhöhte ROS-Bildung fest. Auch Höhler et al. (2000) wiesen einen durch Rotenon verursachten ROS-Anstieg bei PC12-Zellen nach. Hensley et al. (1998) inkubierten isolierte Gehirnmitochondrien mit Rotenon und stellten ebenfalls eine erhöhte ROS-Bildung in Form von H_2O_2 fest. Andere Arbeitsgruppen hingegen konnten bei ihren Studien eine Abnahme der ROS-Bildung nach Behandlung mit Rotenon feststellen. So kam es bei Zulueta et al. (1995) in Endothelzellen, bei Duranteau et al. (1998) in Herzmuskelzellen und bei Chandel et al. (1998) in Hep3B-Zellen zu einem Abfall der ROS-Produktion nach Behandlung mit Rotenon. Dies weist auf unterschiedlich Bildungsorte von ROS innerhalb der Atmungskette in den verschiedenen Zelltypen hin. So konnten Höhler et al. (1999) den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette als Bildungsort von ROS in neuronalen PC12-Zellen ausweisen, während Chandel et al. (2000) nachwies, dass die ROS-Produktion in den nicht-neuronalen Hep3B-Zellen an Komplex III der mitochondrialen Atmungskette stattfindet. Selbst innerhalb einer Studie ließ sich der ROS-erhöhende Effekt von Rotenon in Mitochondrien des Großhirns, aber nicht in Mitochondrien der Leber und des Skelettmuskels nachweisen (Sousa et al., 2003).

Auch in den neuronalen Zellen aus den DRGs der Ratte kam es nach Behandlung mit Rotenon zu einem Anstieg der intrazellulär gebildeten ROS. Entsprechend werden ROS auch in primär afferenten Neuronen an Komplex I der Atmungskette gebildet.

5.2.3 Hypoxie

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an verschiedenen isolierten Zelltypen zeigten Hypoxie-bedingte Veränderungen der ROS-Produktion. Hierbei konnte in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Versuchsanordnung sowohl eine Abnahme als auch eine Zunahme der intrazellulären ROS-Konzentration beobachtet werden. Die Arbeitsgruppen von Höhler et al. (1999) und die Arbeitsgruppe von Duranteau et al. (1998) konnten beispielsweise eine Zunahme der intrazellulären ROS in PC12-Zellen bzw. in Herzmuskelzellen unter Hypoxie feststellen, während die Arbeitsgruppe von Fandrey et al. (1994) in HepG2-Zellen und die Arbeitsgruppe von Kroll und Czyzyk-Krzeska (1998) in PC12-Zellen eine Abnahme der Hypoxie-induzierten ROS-Konzentration verzeichnen konnten. Die Neurone aus den DRGs der Ratte zeigten jedoch in der vorliegenden Untersuchung keine Veränderung der ROS-Produktion unter Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Bedingungen.

Wie lässt sich das Fehlen einer Hypoxie-bedingten Veränderung der ROS-Produktion in Neuronen erklären? Zunächst sind zwei methodisch begründete Ursachen zu betrachten:

1. Es könnte möglich sein, dass die Neurone durch die Behandlung mit den verschiedenen Wirkstoffen und dem Fluoreszenzindikator DCFH-DA in ihren Stoffwechselfunktionen beeinträchtigt oder sogar abgetötet wurden, und somit gar nicht in der Lage waren, auf Hypoxie mit einer Änderung der ROS-Produktion zu reagieren.
2. Die Veränderung der ROS-Produktion unter Hypoxie könnte so gering sein, dass sie mittels der angewandten Messmethodik nicht detektierbar war.

Beide Möglichkeiten können weitgehend ausgeschlossen werden. Die in dieser Untersuchung mitgeführten Positivkontrollen PMA und Rotenon gaben einen deutlichen Hinweis sowohl auf die Vitalität der Neurone, als auch auf ihre Fähigkeit, auf adäquate Stimuli mit einer erhöhten ROS-Produktion reagieren zu können. Beide Wirkstoffe führten zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration in den Neuronen, die durch die angewandte Messtechnik eindeutig festgestellt werden konnte. Prinzipiell könnte die durch Hypoxie bedingte Veränderung in der ROS-Produktion in Neuronen ein wesentlich geringeres Ausmaß einnehmen, als die durch PMA oder Rotenon induzierte. In PC12-Zellen konnten Höhler et al. (1999) jedoch durch Rotenon

und Hypoxie einen gleich hohen Anstieg der ROS-Produktion mit Fluoreszenzindikatoren und LSM nachweisen.

Entsprechend ist davon auszugehen, dass die beobachtete Konstanz der ROS-Produktion unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen nicht ein methodisches Artefakt, sondern das tatsächliche Verhalten der primär afferenten Neurone reflektiert.

5.3 Regulation der ROS-Produktion in Zellen neuronaler und nicht-neuronaler Herkunft unter Hypoxie

5.3.1 ROS-Produktion unter Hypoxie in neuronalen Zellen

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann geschlossen werden, dass ROS keine Rolle im Signaltransduktionsmechanismus in der Reaktion primär afferenter Neurone auf Hypoxie spielen. Die bisherige Annahme war, dass es in den Neuronen wie in anderen Zellen entweder zu einer Hypoxie-induzierten Konzentrationszunahme oder -abnahme intrazellulärer ROS kommt. Die ROS sollten dabei als Signalmoleküle fungieren, welche innerhalb eines Sauerstoffsensormechanismus der Neurone weitere Zellreaktionen vermitteln. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass Hypoxie in den Neuronen zu keiner veränderten ROS-Produktion führt. Demnach können ROS in Neuronen auch nicht als Signalmoleküle für weitere Hypoxie-induzierte Zellreaktionen dienen. Nachfolgend zu der vorliegenden Arbeit konnte dies auch von Yamamoto et al. (2003) für primär afferente Neurone des Ganglion nodosum der Ratte bestätigt werden.

Dennoch kann Hypoxie auf ROS-unabhängigen Wegen zu veränderten Zellreaktionen in den Neuronen führen: Henrich et al. (2000) konnten eine vermehrte NO-Produktion in den gleichen Neuronen unter Hypoxie nachweisen. Höhler et al. (1999) konnten nachweisen, dass es in neuronalen PC12-Zellen zu einer erhöhten Transkription der Tyrosinhydroxylase-mRNA (TH-mRNA) unter Hypoxie kommt. Die Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass parallel zu dieser Zellreaktion ein Produktionsanstieg intrazellulärer ROS in den PC12-Zellen stattfindet, jedoch wird die erhöhte TH-mRNA-Transkription nicht durch die vermehrte ROS-Bildung induziert. Diese Ergebnisse und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen also, dass Neurone sehr wohl Hypoxie-induzierte Zellreaktionen zeigen, wie z.B. die erhöhte NO-Produktion oder die Aktivierung der

TH-mRNA-Transkription. Neurone scheinen sich aber in ihrer Reaktion auf eine reduzierte Sauerstoffspannung von nicht-neuronalen Zellen zu unterscheiden. Und obwohl sich die ROS-Konzentration in den PC12-Zellen von Höhler et al. (1999) unter Hypoxie im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten neuronalen Zellen erhöhte, scheinen ROS weder bei den PC12-Zellen noch in den DRGs der Ratte als Signalmoleküle für weitere Zellreaktionen auf Hypoxie zu dienen.

5.3.2 ROS-Produktion unter Hypoxie in nicht-neuronalen Zellen

Andere Arbeitsgruppen konnten jedoch zeigen, dass ROS in nicht-neuronalen Zellen sehr wohl in Reaktion auf Hypoxie gebildet werden. Die Arbeitsgruppen waren in der Lage einen Zusammenhang zwischen der Hypoxie-induzierten ROS-Bildung und weiteren Zellreaktionen herstellen:

Chandel et al. (1998) konnten nicht nur nachweisen, dass ROS unter Hypoxie in Hep3B-Zellen vermehrt gebildet werden, sondern auch, dass diese ROS aus den Mitochondrien stammen und als Signalmoleküle für weitere Zellreaktionen dienen. Dazu führten sie Untersuchungen an Hep3B-Zellen vom Wildtyp und an rho⁰-Zellen, denen die mitochondriale DNA fehlte, durch. Unter Hypoxie kam es bei den Hep3B-Zellen vom Wildtyp zu einer vermehrten Bildung von ROS. Ausserdem konnte eine vermehrte Produktion von EPO, VEGF und glykolytischen Enzymen festgestellt werden. Die rho⁰-Zellen zeigten unter Hypoxie keinen Anstieg der ROS-Konzentration. Auch die Produktion von EPO, VEGF und glykolytischen Enzymen blieb aus. Chandel et al. (1998) schlussfolgerten daraus, dass Hypoxie die Transkription von EPO, VEGF und glykolytischen Enzymen über eine Erhöhung mitochondrialer ROS aktiviert.

In einer nachfolgenden Untersuchung konnten Chandel et al. (2000) einen weiteren Beweis dafür finden, dass ROS als Signalmoleküle im Sauerstoffsensormechanismus von Hep3B-Zellen und der auf Hypoxie mit Luciferasebildung reagierenden transfizierten humanen Nierenzelllinie 293 fungieren. So führte Hypoxie zu einem Anstieg von ROS in der Nierenzelllinie, wodurch es zu einer Akkumulation der HIF-1 α -Untereinheit und zu einer Luciferasebildung in den Zellen kam. Diese Antwort auf Hypoxie erfolgte jedoch nicht in Zellen, denen die mitochondriale DNA fehlte. Führt man diesen rho⁰-Zellen während einer Normoxiephase exogen H₂O₂ zu, kommt es zu einer Stabilisation der HIF-1 α -Untereinheit und zur Luciferasebildung. Die ROS sind

also verantwortlich und notwendig, um eine Stabilisation der HIF-1 α -Untereinheit und eine damit verbundene Luciferasebildung in der humanen Nierenzelllinie 293 zu erwirken. Chandel et al. (2000) konnten außerdem zeigen, dass die ROS an Komplex III der mitochondrialen Atmungskette gebildet werden. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass Komplex III der Sauerstoffsensor dieser Zellen ist.

Auch Duranteau und Mitarbeiter (1998) konnten zeigen, dass Hypoxie-induzierte ROS als second messenger die Kontraktionsfähigkeit von Kardiomyozyten beeinflussen. Unter Hypoxie kam es zu einer vermehrten Produktion von ROS und zu einer verminderten Kontraktionsfähigkeit in Herzmuskelzellen. Kardiomyozyten unter normoxischen Bedingungen, die mit H₂O₂ inkubiert wurden, verminderten ebenfalls ihre Kontraktionen. Die Zugabe des Antioxidationsmittels 2-Mercaptopropionyl-glycin schwächte die Zunahme der ROS-Konzentration ab und regte die Kardiomyozyten zu vermehrten Kontraktionen an. Diese Ergebnisse zeigen, dass ROS Bestandteile eines Signaltransduktionssystems der Herzmuskelzellen sind. Die ROS werden unter Hypoxie vermehrt gebildet und führen zu einer verminderten Kontraktilität der Zellen. Auch Duranteau et al. (1998) wiesen die Mitochondrien als Bildungsort der unter Hypoxie entstandenen ROS aus.

5.3.3 Vergleichende Betrachtung

Insgesamt betrachtet konnte in der Vergangenheit in Abhängigkeit vom Zelltyp und den experimentellen Bedingungen kein eindeutiges Bild über die Produktion intrazellulär gebildeter ROS unter Hypoxie gewonnen werden. So kam es in in Herzmuskelzellen und PC12-Zellen zu einer Zunahme der ROS unter Hypoxie (Duranteau et al., 1998; Höhler et al., 1999), während es bei anderen Arbeitsgruppen in Hepatomzellen und PC12-Zellen zu einer Abnahme der ROS unter Hypoxie kam (Fandrey et al., 1994; Kroll und Czyzyk-Krzeska, 1998). In nicht-neuronalen Zellen Hep3B-Zellen konnte Komplex III der mitochondrialen Atmungskette als Bildungsort Hypoxie-induzierter ROS ausgemacht werden (Chandel et al., 2000), während Höhler et al. (1999) nachweisen konnten, dass die normoxische Produktion von ROS in den neuronalen PC12-Zellen an Komplex I stattfindet. Die Messungen der vorliegenden Arbeit zeigen eine unveränderte ROS-Produktion in den Neuronen unter Hypoxie. Diese Ergebnisse

weisen zusammengefasst auf einen maßgeblichen Unterschied der mitochondrialen ROS-Produktion in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen hin.

In dieser Arbeit kam es durch Rotenon zu einer Zunahme der ROS-Produktion in den Neuronen. Die gleiche Reaktion auf Rotenon konnten Höhler und Mitarbeiter (1999) bei neuronalen PC12-Zellen beobachten, während es in den meisten nicht-neuronalen Zellen zu einer Abnahme der ROS-Konzentration unter Einfluss von Rotenon kam (Chandel und Schumacker, 2000). Rotenon blockiert den Elektronentransfer zwischen den Eisen-Schwefel-Clustern und Ubiquinon an Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. In neuronalen Zellen scheinen die Elektronen die Elektronentransportkette noch vor der Rotenonbindungsstelle zu verlassen und bilden in Verbindung mit O_2 ROS. Auch die Untersuchungen von Hensley et al. (1998) und Barja und Herrero (1998) an Neuronen aus dem Gehirn von Ratten und Tauben konnten belegen, dass aus diesen Zellen isolierte Gehirnmitochondrien stimuliert werden können, ROS hauptsächlich an Komplex I zu bilden. Die Regulation der mitochondrialen ROS ist zelltypspezifisch und steht in keinem Zusammenhang mit der Anpassung neuronaler Zellen an Hypoxie.

Für einen zelltypspezifischen Sauerstoffsensormechanismus, bei dem ROS nicht unbedingt eine Rolle als Signalmoleküle spielen, sprechen auch die verschiedenen nebeneinander existierenden Sauerstoffsensormodelle, welche an unterschiedlichen Zelltypen erforscht wurden. Das neueste Sauerstoffsensormodell ist die Prolylhydroxylasentheorie. Bei dieser Theorie spielen ROS als Signalmoleküle keine Rolle (Epstein et al., 2001; Ivan et al., 2001). Auch die Ionenkanalhypothese kommt prinzipiell ohne die Beteiligung von ROS aus. Dennoch scheinen die ROS in nicht-neuronalen Zellen eine Rolle in der Reaktion der Zelle auf Hypoxie zu spielen. Es stellt sich die Frage, ob die verschiedenen Sauerstoffsensormodelle als isoliert nebeneinander existierende Modelle, welche nur spezifisch für ein oder mehrere ähnliche Zelltypen in Frage kommen, zu sehen sind, oder ob es einen generellen, allen Zellen gemeinsamen Sauerstoffsensormechanismus gibt, der anschließende zelltypspezifische Folgereaktionen, wie z.B. die ROS-Produktion, auslöst.

Die Reaktionen der Neurone auf PMA und Rotenon zeigen, dass sie durchaus in der Lage sind, über die mitochondriale Atmungskette oder das NADPH-Oxidasen-System ROS zu bilden. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass Neurone auch auf

physiologische Reize mit einer veränderten ROS-Produktion reagieren. Welche Funktion die dabei gebildeten ROS haben könnten, war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Im Signaltransduktionsmechanismus der Antwort auf Hypoxie spielen die ROS in primär afferenten DRG-Neuronen der Ratte jedoch keine Rolle.

6 Zusammenfassung

Sauerstoff ist lebensnotwendig für alle Säugetierzellen und speziell Neurone reagieren besonders empfindlich selbst auf kurze Hypoxiephasen. Um sich vor Hypoxie zu schützen, kann jede Säugetierzelle Sauerstoff messen und mit verschiedenen adaptiven Mechanismen reagieren. Es wird angenommen, dass intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine zentrale Rolle innerhalb dieser adaptiven Mechanismen, wie z.B. einer veränderten Genexpression, spielen.

Abhängig vom untersuchten Zelltyp und den experimentellen Bedingungen konnte in der Vergangenheit sowohl eine Hypoxie-induzierte Zunahme als auch eine Abnahme der intrazellulären ROS beobachtet werden. Die meisten dieser Untersuchungen fanden an isolierten nicht-neuronalen Zellen statt, wie z.B. an Hepatomzellen (Hep3B oder HepG2) oder Kardiomyozyten. Einige Untersuchungen erfolgten auch an neuronalen Zellen, wie z.B. an PC12-Zellen, einer Zelllinie aus einem Nebennierenmarkstumor der Ratte. Innerhalb dieser Studien konnten große Unterschiede der Regulation der ROS-Produktion in den einzelnen Zelltypen festgestellt werden. So kam es z.B. durch die Verwendung eines Hemmstoffes an Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Rotenon) zu einer sinkenden Produktion von ROS in nicht-neuronalen Zellen, aber zu einer steigenden Produktion in kultivierten neuronalen Zellen.

Die Situation in intaktem neuronalen Gewebe ist bis jetzt unbekannt. Deshalb wurden in dieser Arbeit unter Verwendung des Fluoreszenzindikators 2', 7'-Dichlorofluorescein-Diazetat und der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) Untersuchungen an neuronalen Vitalschnitten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Die CLSM erlaubt eine genaue Unterscheidung einzelner Zellen. Mittels der CLSM konnte so spezifisch die neuronale ROS-Produktion gemessen werden. Um den nicht durch Synapsen vermittelten Einfluss von Hypoxie auf die neuronale ROS-Produktion zu analysieren und eine mögliche Überlagerung der Messergebnisse durch ausgeschüttete Transmitter zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit die Spinalganglien der Ratte (DRG) für die Versuche ausgewählt, da in ihnen keine synaptische Umschaltung erfolgt.

Die Inkubation der Vitalschnitte mit dem Aktivator der Protein Kinase C (PKC), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), führte zu einer vermehrten Produktion von ROS in den Neuronen, welche sich in einer höheren Fluoreszenzintensität äußerte. PMA führt

über eine Aktivierung der PKC zu einer Phosphorylierung der NADPH-Oxidase, welche für die Produktion von ROS verantwortlich gemacht wird. In primär afferenten Neuronen wird die ROS-Produktion folglich über einen PKC-abhängigen Mechanismus gesteigert.

Die Inkubation der Vitalschnitte mit Rotenon, einem Hemmstoff des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette führte ebenfalls zu einem Anstieg der ROS-Produktion in den Neuronen. Die gleiche Reaktion auf Rotenon konnten Höhler et al. (1999) bei neuronalen PC12-Zellen beobachten, während es in den meisten nicht-neuronalen Zellen zu einer Abnahme der ROS-Konzentration unter Einfluss von Rotenon kam. Diese Ergebnisse weisen auf einen signifikanten Unterschied der mitochondrialen ROS-Bildung neuronaler und nicht-neuronaler Zellen hin. Rotenon blockiert den Elektronentransfer der mitochondrialen Atmungskette an Komplex I. In neuronalen Zellen verlassen die Elektronen die Elektronentransportkette noch vor der Rotenonbindungsstelle, um in Verbindung mit O₂ ROS zu bilden. Höhler et al. (1999) wiesen den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette als Bildungsort von ROS in neuronalen PC12-Zellen aus, während Chandel et al. (2000) nachwies, dass ROS in nicht-neuronalen Hep3B-Zellen an Komplex III gebildet werden. Die Regulation der mitochondrialen ROS-Produktion ist zelltypspezifisch. In primär afferenten Neuronen der Ratte werden ROS an Komplex I der Atmungskette gebildet.

Unter Hypoxie kam es im Vergleich zu den normoxisch inkubierten Vitalschnitten zu keinem signifikanten Anstieg der ROS-Produktion in den Neuronen. Andere Arbeitsgruppen konnten jedoch zeigen, dass es sowohl in neuronalen, als auch in nicht-neuronalen Zelltypen zu einer veränderten ROS-Produktion unter Hypoxie kam. Einige Arbeitsgruppen waren sogar in der Lage, einen Zusammenhang zwischen der Hypoxie-induzierten ROS-Bildung und weiteren Zellreaktionen herzustellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass Hypoxie in den Neuronen zu keiner veränderten ROS-Produktion führt. Folglich spielen ROS in primär afferenten DRG-Neuronen der Ratte im Signaltransduktionsmechanismus der Antwort auf Hypoxie keine Rolle.

7 Summary

Oxygen is essential for all mammalian cells, and neurons in particular are highly susceptible for even short periods of hypoxia. In general, every cell possesses oxygen sensors and various adaptive mechanisms that protect against the adverse effects of hypoxia. According to one theory of cellular oxygen sensing, intracellularly produced reactive oxygen species (ROS) play a central role by the initiation of such adaptive mechanisms, for example altered gene expression.

Previously, both a hypoxia-induced increase and a hypoxia-induced decrease in cellular ROS-production have been observed, dependent on the cell type under investigation and the experimental conditions. Most of these investigations have been conducted on isolated non-neuronal cells such as hepatoma cells (Hep3B and HepG2) and cardiomyocytes, while some have been performed at neuronal cells such as PC12 cells, a cell line from a rat adrenal medullary tumour. Considerable differences in the regulation of ROS production within these cell types became evident in these studies. One of these differences is marked by the effects of rotenone, an inhibitor of complex I of the mitochondrial respiratory chain. It reduces ROS production non-neuronal cells while enhancing it in cultured neuronal cells.

The situation in intact neuronal tissue is still unclear. This issue was addressed in the present study by use of the fluorescent indicator 2',7'-dichlorofluorescein diacetate and confocal laser scanning microscopy (CLSM) at vital slice preparations under normoxic and hypoxic conditions. CLSM allowed a precise distinction of individual cell types. Thus, using CLSM the neuronal ROS production could be specifically measured in these slice preparations. Dorsal root ganglia (DRG) of the rat were chosen as a model since there is no synaptic transmission within these ganglia and thus, the influence of synapses on hypoxic neuronal ROS production and mixing of the effects by release of transmitters could be avoided.

Incubation of these slice preparations with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), an activator of protein kinase C, resulted in an increased ROS production by neurons. PMA activates the PKC by phosphorylation of the NADPH oxidase which is responsible for

ROS production in that neurons. Thus, ROS productions by primary afferent neurons can be triggered via an PKC dependent mechanism.

Incubation of the slice preparations with rotenone, an inhibitor of complex I of the mitochondrial respiratory chain, also resulted in an increased neuronal ROS production. A similar reaction to rotenone was observed by Höhler et al. (1999) in neuronal PC12 cells while most non-neuronal cell types investigated by other groups responded to rotenone with a decreased ROS production. Rotenone blocks the electron transfer at complex I. Obviously, in neuronal cells electrons leave the electron transport chain proximal to the rotenone binding site to form ROS in conjunction with O₂. Höhler et al. (1999) recognized complex I of the mitochondrial respiratory chain as a production site of ROS in neuronal PC12 cells while Chandel et al. (2000) demonstrated ROS production at complex III in non-neuronal Hep3B cells. Thus, regulation of mitochondrial ROS production is cell type specific. In primary afferent neurons of the rat, ROS are formed at complex I of the respiratory chain.

In previous investigations an altered ROS production has been demonstrated both in neuronal and in non-neuronal cell types. In the present study on DRG slice preparations, however, no significant changes in neuronal ROS production under hypoxia were observed compared to normoxia. Technical reasons such as an inadequate detection system or pure viability of the neurons can be largely excluded due to the successful stimulation of the neurons with PMA and rotenone. Consequently, ROS do not play a major role in the signal transduction mechanisms in response to hypoxia in primary afferent DRG neurons of the rat.

8 Literaturverzeichnis

Acker H, Dufau E, Huber J, Sylvester D (1989)

Indications to an NADPH oxidase as a possible pO₂ sensor in rat carotid body
FEBS Lett, 256: 75-78

Acker H, Bolling B, Delpiano MA, Dufau E, Gorlach A, Holtermann G (1992)

The meaning of H₂O₂ generation in carotid body cells for PO₂ chemoreception
Auton Nerv Syst, 41: 41-51

Acker H und Xue D (1995)

Mechanisms of O₂ sensing in the carotid body in comparison with other O₂-sensing cells
News Physiol Sci, 10: 211-216

Acker H (1994)

Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism
Respir Physiol, 95: 1-10

Afzal M, Matsugo S, Sasai M, Xu B, Aoyama K, Takeuchi T (2003)

Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species
Biochem Biophys Res Commun 304: 619-624

Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalen AM, Sun CQ, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros JA, Lambeth JD (2001)

Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1
Proc Natl Acad Sci, 98: 5550-5555

Barrientos und Moraes (1999)

Titration of the effect of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology

J Biol Chem, 274: 16188-16197

Barja G und Herrero (1998)

Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon

J Bioenerg Biomembr, 30: 235-243

Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M (1983)

Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation

J Immunol, 130: 1910-1917

Bastian NR, Hibbs JB Jr. (1994)

Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase

Curr Opin Immunol, 6: 131-139

Benna JE, Dang PMC, Gaudry M, Fay M, Morel F, Hakim J und Gougerot-Pocidalo MA (1997)

Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67phox during human neutrophil activation

J Biol Chem, 272: 17204-17208

Buckler KJ (1997)

A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells

J Physiol, 498: 649-662

Budinger GR, Chandel N, Shao ZH, Li CQ, Melmed A, Becker LB, Schumacker PT

Cellular energy utilization and supply during hypoxia in embryonic cardiac myocytes
Am J Physiol, 270: L44-L53

Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP (1994)

Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells
J Leukoc Biol, 55: 253-258

Cathcart R, Schwiers E und Ames BN

Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay
Anal Biochem, 134: 111-116

Chance B und Williams GR (1955)

Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation
J Biol Chem, 217: 383-393

Chance B, Sies H, Boveris A (1979)

Hydroperoxide metabolism in mammalian organs
Physiol Rev, 59: 527-605

Chandel NS, Maltepe E, Golwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT (1998)

Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription
Proc Natl Acad Sci USA, 95: 11715-11720

Chandel NS und Schumacker PT (2000)

Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight

J Appl Physiol, 88: 1880-1889

Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT (2000)

Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing

J Biol Chem, 275: 25130-25138

Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD (2001)

Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5

Gene, 269: 131-140

Conforti L, Kobayashi S, Beitner-Johnson D, Conrad PW, Freeman T, Millhorn DE (1999)

Regulation of gene expression and secretory functions in oxygen-sensing pheochromocytoma cells

Respir Physiol, 115: 249-260

Cross AR und Jones OTG (1990)

Enzymic mechanisms of superoxide production

Biochim Biophys Acta, 1057: 281-298

Cross AR, Henderson L, Jones OT, Delpiano MA, Hentschel J, Acker H (1990)

Involvement of an NAD(P)H oxidase as a pO₂ sensor protein in the rat carotid body

Biochem J, 272: 743-747

Crow JP (1997)

Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species

Nitric Oxide, 1: 145-157

DiGregorio KA, Cilento EV, Lantz RC (1987)

Measurement of superoxide release from single pulmonary alveolar macrophages

Am J Physiol, 252: C677-C683

Donnelly DF (1999)

K⁺ currents of glomus cells and chemosensory functions of carotid body

Respir Physiol, 115: 151-160

Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW (1995)

Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate

J Neurosci, 15: 6377-6388

Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z und Schumacker PT (1998)

Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes

J Biol Chem, 273: 11619-11624

Dusi und Rossi (1993)

Activation of NADPH oxidase of human neutrophils involves the phosphorylation and the translocation of cytosolic p67phox

Biochem J, 296: 367-371

Dvorakova M, Höhler B, Richter E, Burritt JB und Kummer W (1999)

Rat sensory neurons contain cytochrome b₅₅₈ large subunit immunoreactivity
Neuro Report, 10: 2615-2617

Dvorakova M, Höhler B, Vollerthun R, Fischbach T, Kummer W (2000)

Macrophages: a major source of cytochrome b₅₅₈ in the rat carotid body
Brain Research, 852: 349-354

Earley FG, Patel SD, Ragan I, Attardi G (1987)

Photolabelling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with
[3H]dihydrorotenone
FEBS Lett, 219: 108-112

**Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR,
Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton
DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ,
Ratcliffe PJ (2001)**

C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that
regulate HIF by prolyl hydroxylation
Cell, 107: 43-54

Fandrey J, Frede S, Jelkmann W (1994)

Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production
Biochem J, 303: 507-510

Fearon IM, Palmer AC, Balmforth AJ, Ball SG, Varadi G, Peers C (1999)

Modulation of recombinant human cardiac L-type Ca₂₊ channel α_1C subunits by
redox agents and hypoxia
J Physiol, 514: 629-637

Finkel T (1998)

Oxygen radicals and signaling

Curr Opin Cell Biol, 10: 248-253

Fleidervish IA, Gebhardt C, Astman N, Gutnick MJ, Heinemann U (2001)

Enhanced spontaneous transmitter release is the earliest consequence of neocortical hypoxia that can explain the disruption of normal circuit function

J Neurosci, 21: 4600-4608

Franco-Obregon A, Lopez-Barneo J (1996)

Differential oxygen sensitivity of calcium channels in rabbit smooth muscle cells of conduit and resistance pulmonary arteries

J Physiol, 491: 511-518

Freeman BA, Crapo JD (1982)

Biology of disease: free radicals and tissue injury

Lab Invest, 47: 412-426

Friedrich T, Strohdeicher M, Hofahus G, Preis D, Sahm H und Weiss H (1990)

The same domain motif for ubiquinone reduction in mitochondrial or chloroplast NADH dehydrogenase and bacterial glucose dehydrogenase

FEBS Lett, 265: 37-40

Fukui T, Lassegue B, Kai H, Alexander RW, Griendling KK (1995)

Cytochrome b-558 alpha-subunit cloning and expression in rat aortic smooth muscle cells

Biochim Biophys Acta, 1231: 215-219

Furstenberger G, Berry DL, Sorg B, Marks F (1981)

Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process

Proc Natl Acad Sci, 78: 7722-7726

Ganformina MD und Lopez-Barneo J (1991)

Single K⁺ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension

Proc Natl Acad Sci USA, 88: 2927-2930

Geiszt M, Kopp JB, Varnai P und Leto TL (2000)

Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney

PNAS, 97: 8010-8014

Genova ML, Bovina C, Marchetti M, Pallotti F, Tietz C, Biagini G, Pugnaroni A, Viticchi C, Gorini A, Villa RF und Lenaz G (1997)

Decrease of rotenone inhibition is a sensitive parameter of complex I damage in brain non-synaptic mitochondria of aged rats

FEBS Lett, 410: 467-469

Görlach A, Holtermann G, Jelkmann W, Hancock, Jones SA, Jones OTG und Acker H (1993)

Photometric characteristics of haem proteins in erythropoietin-producing hepatoma cells (HepG2)

Biochem J, 290: 771-776

Goldberg MA und Schneider TJ (1994)

Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin

J Biol Chem, 269: 4355-4359

Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF (1988)

Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein
Science, 242(4884): 1412-1415

Goldwasser E, Jacobson LO, Fried W und Plzak LF, (1958)

The effect of cobalt on the production of erythropoietin
Studies Erythropoiesis, 13: 55-60

Heinecke JW, Meier KE, Lorenzen JA Shapiro BM (1990)

A specific requirement for protein kinase C in activation of the respiratory burst oxidase
of fertilization
J Biol Chem, 265: 7717-7720

Henrich M, Hoffmann K, König P, Groß M, Fischbach T, Gödecke A, Hempelmann G, Kummer W (2000)

Sensory neurons respond to hypoxia with NO production associated with mitochondria
Mol Cell Neurosci 20: 307-322

Hensley K, Pye QN, Maitt ML Stewart CA, Robinson KA, Jaffrey F und Floyd RA (1998)

Interaction of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron and alternative electron acceptors with
complex I indicates a substrate reduction site upstream from the rotenone binding site
J Narchem, 71: 2549-2557

Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET (1998)

Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c
release, membrane permeability transition, and apoptosis
Oncogene, 17: 2515-2524

Höhler B, Lange B, Holzapfel B, Goldenberg A, Hänze J, Sell A, Testan H, Möller W, Kummer W (1999)

Hypoxic upregulation of tyrosine hydroxylase gene expression is paralleled, but not induced by increased generation of reactive oxygen species in PC12 cells
FEBS, 457: 53-56

Höhler B, Holzapfel B, Kummer W (2000)

NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells
Histochem Cell Biol, 114: 29-37

Hofer T, Spielmann P, Stengel P, Stier B, Katschinski DM, Desbaillets I, Gassmann M, Wenger RH (2001)

Mammalian PASKIN, a PAS-serine/threonine kinase related to bacterial oxygen sensors
Biochem Biophys Res Commun, 288: 757-764

Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS (2002)

Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3
J Biol Chem, 277: 39792-39800

Imlay JA, Chin SM, Linn S (1988)

Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro
Science, 240: 640-642

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H (2000)

High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells

Diabetes, 49: 1939-1945

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin Jr WG (2001)

HIF α targeted for VHL-mediated destruction by prolin hydroxylation: implications for oxygen sensing

Science, 292: 464-468

Jaakola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001)

Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation

Science, 292: 468-472

Jones SA, Hancock JT, Jones OT, Neubauer A und Topley N (1995)

The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox and p22phox

J Am Soc Nephrol, 5: 1483-1491

Karnovsky Morris J (1994)

Cytochemistry and reactive oxygen species: a retrospective

Biochemistry, 102: 15-27

Kivirikko KI und Pihlajaniemi T (1998)

Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases

Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 72: 325-398

Kroll SL, Czyzyk-Krzeska MF (1998)

Role of H₂O₂ and heme-containing O₂ sensors in hypoxic regulation of tyrosine hydroxylase gene expression

Am J Physiol, 274: C167-174

Kummer W und Acker H (1995)

Immunohistochemical demonstration of four subunits of neutrophil NAD(P)H oxidase in type I cells of carotid body

J Appl Physiol, 78: 1904-1909

Kummer W und Acker H (1997)

Cytochrome b₅₅₈ and hydrogen peroxide production in small intensely fluorescent cells of sympathetic ganglia

Histochem Cell Biol, 107: 151-158

Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK (2001)

Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways

Circ Res, 88: 888-894

Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA (1995)

Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia

J Biol Chem, 270: 13333-13340

Lindahl PE und Öberg KE (1961)

Effect of rotenone on respiration and its point of attack

Exp Cell Res, 23: 228-237.

Littauer A und de Groot H (1992)

Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation: three phases and role of mitochondria

Am J Physiol, 262(6 Pt 1): G1015-G1020.

Lopez-Barneo J, Lopez-Lopez JR, Ureana J und Gonzalez C (1988)

Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells

Science, 241: 580-582

Marey-Semper I, Gelman M, Levi-Strauss M (1993)

The high sensitivity to rotenone of strial dopamine uptake suggests the existence of a constitutive metabolic deficiency in dopaminergic neurons from the substantia nigra

Eur J of Neurosci, 5: 1029-1034

Miller JW, Selhub J, Joseph JA (1996)

Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin

Free Radic Biol Med, 21: 241-249

Murphy HS, Yu C, Quddus J (2000)

Functional expression of NAD(P)H oxidase p47 in lung microvascular endothelial cells

Biochem Biophys Res Commun, 278: 584-589

Nausee WM, Volpp BD, McCormick S, Leidal KG und Clark RA (1991)

Assembly of neutrophil respiratory burst oxidase

J Biol Chem, 266: 5911-5917

Niedel JE, Kuhn LJ, Vandenberg GR (1983)

Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C

Proc Natl Acad Sci, 80: 36-40

Noh KM, Koh JY (2000)

Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes

J Neurosci, 20: RC111

Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, Smith TJ, Ramakrishnan S, Hutter J, Schramm M, Flamme I (2002)

Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors

Biochem Biophys Res Commun, 296: 343-349

Paddenberg R, Ishaq B, Goldenberg A, Faulhammer P, Rose F, Weissmann N, Braun-Dullaeus, Kummer W (2003)

Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 284: L710-L719

Palmer G, Horgan DJ, Tisdale H, Singer TP und Beinert H (1968)

Studies on respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase XIV. Location of the sites of inhibition of rotenone, barbiturates and piericidin by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy
J Biol Chem, 243: 844-847

Papa S und Skulachev VP (1997)

Reactive oxygen species, mitochondria apoptosis and aging
Mol cell biochem, 174: 305-319

Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR und Gonzalez C (1999)

Kvbeta1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O₂ sensitivity to Kv4.2 but not to Shaker channels
Gen Physiol, 113: 897-907

Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G, Wolf G (1997)

2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation
FEBS Lett, 416: 175-178

Poyton RO (1999)

Models for oxygen sensing in yeast: implications for oxygen-regulated gene expression in higher eucaryotes
Resp Physiol, 115: 119-133

Prabhakar NR (2000)

Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors
J Appl Physiol, 88: 2287-2295

Ragan CI (1990)

Structure and function of an archetypal respiratory chain complex: NADH-ubichinone reductase

Biochem soc Trans, 18: 515-516

Regier DS, Greene DG, Sergeant S, Jesaitis AJ und McPhail LC (2000)

Phosphorylation of p22^{phox} is mediated by phospholipase D -dependent and -independent mechanisms

J Biol Chem, 275: 28406-28412

Rhee SG (1999)

Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger

Exp Mol Med, 31: 53-59

Rodney E., Shackelford, William K. Kaufmann und Ricard S. Paules (2000)

Oxidative Stress and cell cycle checkpoint function

Free Radical Biology & Medicine, Vol. 28: 1387-1404

Rothe G, Oser A und Valet G (1988)

Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes

Naturwissenschaften, 75: 354-355

Royall JA und Ischiropoulos (1993)

Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells

Arch Biochem Biophys, 302: 348-355

Rustenbeck I, Dickel C, Herrmann C und Grimmsmann T (1999)

Mitochondria present in excised patches from pancreatic B-cells may form microcompartments with ATP-dependent potassium channels

Biosci Rep, 19: 89-98

Salceda S, Caro J (1997)

Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes

J Biol Chem, 272: 22642-22647

Sawada GA, Raub TJ, Decker DE, Buxser SE (1996)

Analytical and numerical techniques for the evaluation of free radical damage in cultured cells using scanning laser microscopy

Cytometry, 25: 254-262

Seaton TA, Cooper JM und Schapira AHV (1997)

Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors

Brain research, 777: 110-118

Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL (1994)

Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1

J Biol Chem, 269: 23757-23763

Semenza GL (1999)

Perspectives on oxygen sensing

Cell, 98: 281-284

Semenza GL (2001)

HIF-1 and mechanism of hypoxia sensing

Curr Opin Cell Biol, 13: 167-171

Sijtsema NM, Tibbe AGJ, Segers-Nolten IGM, Verhoeven AJ, Weening JG, Greve Jan und Otto C (2000)

Intrazelluläre Reaktionen in einzelnen menschlichen Granulozyten nach Phorpol-Myristat-Acetat-Aktivierung unter Verwendung von konfokaler Raman-Mikrospektroskopie

Biophys J, 78: 2606-2613

Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA, Crapo JD (1986)

Intrazelluläre Lokalisation von Kupfer-Zink- und Mangan-Superoxid-Dismutasen in Leberparenchymzellen

Lab Invest, 55: 363-371

Sousa SC, Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF (2003)

Ca²⁺-induzierter oxidativer Stress in Gehirnmitochondrien nach Behandlung mit dem Respiratorischen Ketteninhibitor Rotenon

FEBS, 543: 179-183

Srinivas V, Zhu X, Salceda S, Nakamura R, Caro J (1998)

Hypoxie-induzierbares Faktor 1α (HIF-1α) ist ein nicht-häme-eisner Protein. Implikationen für Sauerstoff-Sensing

J Biol Chem, 273: 18019-18022

Strasser A, Stanimirovic D, Kawai N, Mc Carron RM, Spatz M (1997)

Hypoxie moduliert die freie Radikalbildung im Gehirn-mikrovasculären Endothelium

Acta Neurochir Suppl, 70: 8-11

Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD (1999)

Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1
Nature, 401: 79-82

Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Hiroyuki N und Sumimoto H (2003)

Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxid-producing NADPH-Oxidase
J Biol Chem, Apr 25: [epub ahead of print]

Tammariello SP, Quinn MT und Estus S (1999)

NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived symphthetic neurons
J Neurosci, 20: RC53

Thannickal VJ, und Fanburg BL (1995)

Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1
J Biol Chem, 270: 30334-30338

Thannickal VJ, und Fanburg BL(2000)

Reactive oxygen species in cell signaling
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 279: L1005-L1028

Tolbert NE, Essner E (1981)

Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes
J Cell Biol, 91: 271s-283s

Turrens und Boveris (1980)

Generation of superoxide anion by NADPH dehydrogenase of bovine heart mitochondria

Biochem J, 191: 421-427

Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985)

Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria

Arch Biochem Biophys, 237: 408-414

Ullrich V und Bachschmid M (2000)

Superoxide as a messenger of endothelial function

Biochem Biophys Res Com, 278: 1-8

Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT (1998)

Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes

J Biol Chem, 273: 18092-18098

Wang D, Youngson C, Wong V, Yeger H, Dinauer MC, Vega-Saenz ME, Rudy B und Cutz E (1996)

NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K^+ channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines

Proc Natl Acad Sci, 93: 13182-13187

Wenger RH, Marti HH, Schuerer-Maly CC, Kvietikova I, Bauer C, Gassmann M und Maly FE (1996)

Hypoxic induction of gene expression in chronic granulomatous disease-derived B-cell lines: Oxygen sensing is independent of the cytochrome b558-containing nicotinamide dinucleotide phosphate oxidase
Blood, 87: 756-761

Wenger RH, Gassmann M (1997)

Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1
Biol Chem, 378: 609-616

Wolin MS, Burke-Wolin TM, Mohazzab-H. KM (1999)

Roles for NADPH-Oxidase and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms
Resp Physiol, 115: 229-238

Yamamoto Y, Henrich M, Snipes RL, Kummer W (2003)

Altered production of nitric oxide and reactive oxygen species in rat nodose ganglion neurons during acute hypoxia
Brain Res, 961: 1-9

Youngson C, Nurse C, Yeger H, Cutz E (1993)

Oxygen sensing in airway chemoreceptors
Nature, 365(6442): 153-155

Youngson C, Nurse C, Yeger H, Curnutte JT, Vollmer C, Wong V, Cutz E (1997)

Immunocytochemical localization on O₂-sensing protein (NADPH oxidase) in chemoreceptor cells
Microsc Res Tech, 37: 101-106

Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS (2001)

HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive prolin hydroxylation

PNAS, 98: 9630-9635

Zhu WH, Conforti L, Czyzyk-Krzeska MF, Millhorn DE (1996)

Membrane depolarization in PC-12 cells during hypoxia is regulated by an O₂-sensitive

K⁺ current

Am J Physiol, 271: C658-C665

9 Anhang

9.1 Eigene Veröffentlichungen zu dem Thema

Henrich M, Hoffmann K, König P, Gruß M, Fischbach T, Gödecke A, Hempelmann G, Kummer W (2002)

Sensory neurons respond to hypoxia with NO production associated with mitochondria
Molecular and Cellular Neuroscience, 20: 307-322

9.2 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all den Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der allererste Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Kummer für die Vergabe des Themas, die besonders freundliche Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die intensive Betreuung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. M. Kressin danke ich sehr für die Betreuung und Vertretung im Fachbereich Veterinärmedizin.

Allen Mitarbeitern des Anatomischen Institutes danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanken möchte ich mich bei Michael Henrich für seine Unterstützung während des praktischen Teils dieser Arbeit. Ein „Riesendankeschön“ auch an Martin Bodenbenner und Tamara Fischbach, für die Einarbeitung im Labor, für ihren Humor und ihre unermüdliche Geduld bei allen aufgetretenen Problemen. Bei Frau Karola Michael bedanke ich mich für die Unterstützung beim Anfertigen der Grafiken.

Ein besonderes Lob gilt auch Joe Sternheimer für das Formatieren dieser Arbeit und Carmen Glomsda für die Korrektur der Rechtschreibung.

Meine Freunde und meine Schwester waren es, die mich in guten und in schlechten Zeiten immer wieder motiviert haben. Ich danke deshalb herzlich Joe Sternheimer, Carmen Glomsda, Anita Johanni, Andrea Obst, Ute Berkenhoff, Gaby Henkel, Christian Bauer und Alexandra Sell, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die Gespräche mit Euch, Eure Freundschaft und Eure Unterstützung haben maßgeblich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Mein vorletzter Dank gilt allen, die sich bis hierher durchgekämpft haben. Eine wichtige Zeile kommt noch.

Mein letzter Dank gilt jenen, denen ich am meisten zu verdanken habe, nämlich meinen Eltern.

ISBN 3-936815-99-2



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75
e-mail: [Geschaeftsstelle @dvg.net](mailto:Geschaeftsstelle@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.net>