Differenzierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Untersuchung der Spezifität des ROS-Fluoreszenzindikators H_2R bei PC12-Zellen der Ratte unter Hypoxie

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

vorgelegt von

Hakan Tastan

aus Flensburg

Gießen, 2008

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktorin: Prof. Dr. E. Baumgart-Vogt

Gutachter: Prof. Dr. Kummer
Gutachter: Prof. Dr. Schermuly

Tag der Disputation: 19.08.2008

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

INHALTSVERZEICHNIS

1.	**Einleitung**	**1**
1.1	Sauerstoffhomöostase und Hypoxie	1
1.2	PC12-Zellen	1
1.3	Sauerstoffsensormodelle	2
1.4	Reaktive Sauerstoffspezies	4
1.5	Extra-mitochondriale ROS-Quellen	5
1.5.1	NAD(P)H-Oxidase	5
1.5.2	Xanthin-Oxidase	6
1.6	Mitochondriale ROS-Quellen	6
1.7	Aufbau und Funktion des Mitochondriums	7
1.7.1	Äußere und innere Mitochondrienmembran	7
1.7.2	Mitochondrienmatrix	8
1.7.3	Mitochondriale Atmungskette	8
1.8	Messung intrazellulärer ROS-Bildung	9
1.9	Fragestellung und Ziel	10
2.	**Material und Methodik**	**12**
2.1	Zellkultur	12
2.1.1	Zelllinie	12
2.1.2	Medium für PC12-Zellen	12
2.1.3	Trypsinisieren (Splitten)	12
2.1.4	Einfrieren der PC12-Zellen	12
2.1.5	Revitalisieren	13
2.1.6	Beschichtung der culture slides	13
2.2	Versuchsansatz und –durchführung	13
2.2.1	Aussaat der Zellen	13
2.2.2	Reagenzien	14
2.2.3	Kombination der eingesetzten Substanzen	16

2.2.4	Inkubation der Zellen	16
2.3	ROS-Messungen	17
2.3.1	Laserscanning	17
2.3.2	Messvorgang	17
2.3.3	Messreihenfolge	18
2.4	Statistische Auswertung	18
2.5	Rezepturen eingesetzter Lösungen	18
3.	**Ergebnisse**	**20**
3.1	Normoxie-/Hypoxieversuche unter Kontrollbedingungen bei PC12-Zellen	20
3.2	Normoxie-/Hypoxieversuche nach EBS-Exposition bei PC12-Zellen	22
3.3	Normoxie-/Hypoxieversuche nach DMTU-Exposition bei PC12-Zellen	25
3.4	Normoxie-/Hypoxieversuche nach Kat-Exposition bei PC12-Zellen	28
3.5	Normoxie-/Hypoxieversuche nach PHEN-Exposition bei PC12-Zellen	31
3.6	Normoxie-/Hypoxieversuche nach L-NMMA-Exposition bei PC12-Zellen	35
3.7	Normoxie-/Hypoxieversuche nach CYS-Exposition bei PC12-Zellen	38
3.8	Normoxie-/Hypoxieversuche nach NBT-Exposition bei PC12-Zellen	41
4.	**Diskussion**	**44**
5.	**Zusammenfassung**	**51**

6. Summary 53

7. Literaturverzeichnis 55

8. Danksagung 73

9. Lebenslauf 74

1. Einleitung

1.1 Sauerstoffhomöostase und Hypoxie

Ein konstanter Sauerstoffpartialdruck in allen Geweben ist für höhere Organismen lebensnotwendig. Sowohl das respiratorische als auch das kardiovaskuläre System sind daran beteiligt, das Gewebe mit dem benötigten Sauerstoff zu versorgen. Die Zellen selbst sind ebenfalls in der Lage, bei Veränderungen des O_2-Drucks verschiedene adaptive Mechanismen zu induzieren, um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten (Guillemin und Krasnow, 1997). Sauerstoff dient als Elektronenakzeptor im Rahmen der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und bei vielen anderen organischen und anorganischen Reaktionen. Die Eigenschaft, Metaboliten zu oxidieren, dient dabei oft der Umwandlung in Energie, insbesondere in Form von ATP. Hypoxie besteht, wenn das Sauerstoffangebot bzw. die Sauerstoffversorgung unter das Niveau sinkt, das benötigt wird, um physiologische O_2-Drücke des betreffenden Gewebes aufrecht zu erhalten, d.h. sobald der Sauerstoffbedarf das -angebot übersteigt (Leniger-Follert et al., 1975). Sinkt der Sauerstoff-Partialdruck unter einen kritischen Wert im betroffenen Gewebe, so werden verschiedene adaptive Mechanismen aktiviert.

1.2 PC12-Zellen

Ein O_2-sensitives Regulationssystem ermöglicht die physiologische Antwort auf Hypoxie, indem es den Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von Blut und Gewebe innerhalb der physiologischen Grenzen konstant hält (Acker, 1993; López-Barneo et al., 1997; Conforti et al., 1999). Dieses Regulationssystem verfügt über spezielle chemosensitive Zellen, zu denen unter anderem auch paraganglionäre Zellen gehören (Kummer, 1996; Conforti et al., 1999). Paraganglien sind Hypoxie-sensitive Organe, die kontinuierlich den pO_2 messen und bei Hypoxie adaptive Reaktionen des Körpers, wie die reflektorische Hyperventilation und Katecholaminfreisetzung, initiieren (Kummer, 1996). Unterschieden werden retroperitoneale Paraganglien, zu denen als Sonderform das Nebennierenmark gehört, und die Glomera (Kummer, 1996). Besonders während des hypoxischen Stresses zum Zeitpunkt des Geburtsvorganges ist die Sekretion von

Kreislauf-aktivierenden Katecholaminen aus dem Nebennierenmark für das Überleben des Fetus essenziell (Lagercrantz, 1996).

Paraganglien sind durch das Vorkommen zweier Zelltypen charakterisiert, die Hauptzellen (Typ I-Zellen) und die Hüllzellen (Typ II-Zellen). Die Hauptzellen speichern in ihren sekretorischen Vesikeln Katecholamine und Serotonin, die unter Hypoxie freigesetzt werden. Diese Typ I-Zellen werden von den Ausläufern der Hüllzellen bedeckt (Kummer, 1996).

Greene und Tischler (1976) isolierten eine Tumorzelllinie (PC12-Zellen) aus dem Nebennierenmark der Ratte, die eine hohe Sensitivität gegenüber O_2-Schwankungen aufweist (Conforti et al., 1999) und sich daher sehr gut für Studien des O_2-messenden Mechanismus der Paraganglien eignet. Sie stellt deshalb ein Modellsystem für O_2-chemosensitive Zellen dar (Czyzyk-Krzeska et al., 1994; Zhu et al., 1996; Taylor und Peers, 1998). Sie entsprechen morphologisch den O_2-sensitiven Typ I-Zellen. Hypoxische Bedingungen führen in beiden Zelltypen zu einer Hemmung von K^+-Kanälen (Buckler, 1999; Conforti & Millhorn, 2000), die eine Membrandepolarisation und einen Ca^{2+}-Einstrom induzieren (Lopez-Barneo, 1988; Lopez-Barneo, 1996). Es kommt zu einer verstärkten Genexpression von Tyrosinhydroxylase (Czyzyk-Krzeska et al., 1992; Czyzyk-Krzeska et al., 1994; Spicer & Millhorn, 2003) und zur Katecholaminfreisetzung (Kumar et al., 1998; Taylor und Peers, 1998).

1.3 Sauerstoffsensormodelle

Trotz zunehmender Erkenntnisse über die Hypoxie-induzierten zellulären Reaktionen wurden die O_2-Sensoren in chemosensitiven Zellen noch nicht eindeutig identifiziert. Die genauen Mechanismen, mit denen Zellen die Änderungen des pO_2 detektieren und diese in eine physiologische, adaptive Antwort umwandeln, sind nach wie vor nur unvollständig bekannt (Acker et al., 1992; López-Barneo et al., 1997; Conforti et al., 1999; Semenza, 1999; Chandel und Schumacker, 2000).

Es gibt unterschiedliche O_2-Sensormodelle, die diskutiert werden. Einige Arbeitsgruppen konnten z.B. O_2-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 O_2-Sensoren der Zelle vor, welche in der Lage sind, Sauerstoff direkt zu binden und eine O_2-abhängige

Konformationsänderung durchzuführen. Diese Konformationsänderung soll zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen.

Eine andere Hypothese besagt, dass eine membrangebundene NADPH-Oxidase ähnlich der NADPH-Oxidase der Neutrophilen und Makrophagen als O_2-Sensor in Frage kommt. Diese NADPH-Oxidase soll in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration H_2O_2 produzieren. Das gebildete H_2O_2 dient als second messenger und reguliert die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen und die Expression von bestimmten Genen (Acker, 1994; Acker und Xue, 1995).

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 Transkriptions-faktors Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) durch Prolylhydroxylasen (PHD) kontinuierlich hydroxyliert (Jaakola et al., 2001; Ivan et al., 2001). Das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (pVHL) vermittelt dann die Ubiquitinierung und Degradation von HIF (Maxwell et al., 1999; Srinivas et al., 1999; Cockman et al., 2000; Kim und Kaelin, 2003). Die Prolylhydroxylierung wird durch Hypoxie inhibiert und führt zu einer Anreicherung von HIF (Ivan et al., 2001; Jaakola et al., 2001). Die PHD sind ein Eisen- und 2-Oxoglutarat-abhängiges Enzymsystem, die für ihre Funktion des Weiteren Ascorbat und molekularen Sauerstoff benötigen. Sie gelten deshalb unter anderem als Sauerstoffsensoren in der Zelle, insbesondere, wenn Änderungen in der Genexpression eingeleitet werden (Acker und Acker, 2004).

Sell (2001) konnte in Hypoxieversuchen zeigen, dass Mitochondrien als O_2-Sensoren in PC12-Zellen fungieren. Es wurde festgestellt, dass es unter Hypoxie zu einem Anstieg der in den Mitochondrien gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt.
Um die zellulären Reaktionsmechanismen auf O_2-Mangel genauer zu untersuchen, führten Höhler et al. (1999; 2000) Hypoxie-Experimente an PC12-Zellen durch. Wie zuvor von anderen Arbeitsgruppen bei Kardiomyozyten (Duranteau et al., 1998) und Hep3B-Zellen (Chandel et al., 1998) beschrieben, konnten auch Höhler et al. (1999; 2000) einen Hypoxie-bedingten Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beobachten. Zudem konnten Duranteau et al. (1998) bei Kardiomyozyten und Chandel et al. (1998) bei Hep3B-Zellen zwischen der Hypoxie-bedingten ROS-Zunahme und den anschließenden Zellreaktionen einen Zusammenhang nachweisen.

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden im Rahmen des enzymgebundenen Elektronentransports gebildet, der in allen biologischen Systemen einen wichtigen, natürlichen Prozess darstellt (Sharp und Chapman, 1999). Es handelt sich dabei um äußerst reaktionsfähige Sauerstoffverbindungen, die als Nebenprodukt des Zellstoffwechsels gebildet werden. Die Einteilung der ROS erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Strukturen und Ladungen in Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot -}$), Hydroxylradikale ($OH^{\cdot}$), Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Radikale sind chemisch äußerst aggressiv und reagieren leicht mit Molekülen ihrer Umgebung. H_2O_2 zählt wegen seiner Reaktionsfreudigkeit ebenfalls zu den ROS, obwohl es sich bei diesem Molekül nicht um ein Radikal handelt (Rodney et al., 2000).

Der Organismus schützt sich vor der toxischen Wirkung der Radikale durch verschiedene Mechanismen (Slot et al., 1986). Übersteigt die zelluläre Produktion von ROS die Kapazität der Schutzmechanismen, so 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 haben in niedrigen Konzentrationen auch eine Funktion als second messenger und spielen eine wichtige Rolle im zellulären Signaltransduktionssystem (Finkel, 1998; Rhee, 1999; Ulrich und Bachschmid, 2000). An verschiedenen Zelltypen konnten Studien zudem zeigen, dass ROS auch unter Hypoxie als second messenger von besonderer Bedeutung für den Organismus sind (Chandel und Schumacker, 2000).

Es kommen verschiedene zelluläre Enzymsysteme als Entstehungsort für ROS in Frage, die entweder im Zytosol oder in den Mitochondrien lokalisiert sind (Cross und Jones, 1990; Zulueta et al., 1995; Jones et al., 1996; Kummer und Acker, 1997).

1.5 Extra-mitochondriale ROS-Quellen

1.5.1 NAD(P)H-Oxidase

Paraganglien schützen den Organismus vor hypoxischen Zuständen (Kummer, 1996), indem sie mit einem noch weitgehend unbekannten Mechanismus (López-Barneo et al., 1997; Conforti et al., 1999) den arteriellen pO_2 messen und adaptive Reaktionen im Körper initiieren (Kummer, 1996). Eines der Modelle zum O_2-messenden Mechanismus von Paraganglien beinhaltet, dass eine Flavohämoprotein-haltige NAD(P)H-Oxidase (NOX) unter Normoxie kontinuierlich eine gleichbleibende Menge an ROS bildet. NOX reduziert molekularen Sauerstoff in das Superoxid-Anion $O_2^{\cdot -}$, das zu Wasserstoffperoxid umgewandelt wird. Die gebildeten ROS werden zur Abwehr pathogener Mikroorganismen eingesetzt (Karnovsky, 1994; Babior, 1999). Mit ansteigendem pO2 kommt es zu einer erhöhten Produktion von Superoxid-Anionen und/oder Wasserstoff-peroxid (Wolin et al., 2005).

Unter Hypoxie führt die verminderte O_2-Verfügbarkeit zu einer verlangsamten, geringeren ROS-Produktion, wodurch physiologische zelluläre Reaktionen aktiviert werden (Acker et al., 1992; Kroll und Czyzyk-Krzeska, 1998; Chandel und Schumacker, 2000).

Katalysiert wird die Bildung der ROS durch eine aus mehreren Proteinkomponenten bestehende NOX2 der neutrophilen Granulozyten (Cross und Jones, 1990; Karnovsky, 1994). Verschiedene Proteinkomponenten der NOX2 wurden 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 konnten an Typ I Zellen des Glomus caroticum (Kummer und Acker, 1995), an neuroepithelialen Körperchen der Lunge (Youngson et al., 1997) sowie an Erythropoetin-produzierenden HepG2-Lebertumorzellen nachgewiesen werden (Görlach et al., 1993). Bislang konnten die NADPH-Oxidasen 1-5 (NOX1-5) klassifiziert werden (Cheng et al., 2001). Als NOX2 wird die neutrophile NADPH-Oxidase bezeichnet (Cheng et al., 2001; Takeya et al., 2003). NOX4 wurde zunächst als „renal nox“ beschrieben und als potenzieller Sauerstoffsensor, der die Produktion von Erythropoetin kontrolliert, vorgeschlagen (Geiszt et al., 2000). Das Enzym spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Regulation von HIF-2 in humanen Nierenzellkarzinomzellen (Maranchie und Zhan, 2005). NOX1 spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung des Angiotensin II-

induzierten Bluthochdrucks (Dikalova et al., 2005; Matsuno et al., 2005; Gavazzi et al., 2006). Ebenso konnte nach Koexpression von NoxO1 (NAD(P)H-Oxidase Organizer1) und NoxA1 (NAD(P)H-Oxidase Aktivator1) in einer NOX1-exprimierende Zelllinie sowohl eine basale (Banfi et al., 2003; Cheng und Lambeth, 2004), als auch eine PMA-induzierbare (Geiszt et al., 2003; Takeya et al., 2003) Bildung von Superoxidanionen beobachtet werden.

1.5.2 Xanthin-Oxidase

Die Xanthin-Oxidase (XO) stellt ein weiteres $O_2^{\cdot -}$-produzierendes Enzym 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 Bachschmid, 2000). Andere Studien konnten jedoch zeigen, dass die Hypoxie-induzierte ROS-Bildung vor allem in Endothelzellen nicht auf eine XO-Produktion zurückzuführen ist (De Groot und Littauer, 1988; Littauer und De Groot, 1992; Hawes und Watts, 1993; Zulueta et al., 1995).

1.6 Mitochondriale ROS-Quellen

Als mögliche potenzielle ROS-Quellen der Zelle kommen ebenfalls Mitochondrien in Frage (Boveris und Chance, 1973; Turrens und Boveris, 1980). Boveris und Chance (1973) konnten an zahlreichen Untersuchungen an Mitochondrien, die aus den unterschiedlichsten Geweben isoliert wurden, zeigen, dass Säugetiermitochondrien unter physiologischen Bedingungen H_2O_2 produzieren. Verschiedene Studien konnten auch nachweisen, dass ein Zusammenhang zwischen den von den Mitochondrien gebildeten ROS und dem O_2-Sensormechanismus besteht (Chandel et al., 1998; Duranteau et al., 1998). Die Rolle der ROS wird jedoch kontrovers diskutiert, denn Duranteau et al. (1998) konnten an Kardiomyozyten zeigen, dass die ROS-Konzentration unter Hypoxie zunimmt. Chandel et al. (1998) forschten zur gleichen Zeit an Hep3B-Zellen und kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass Hypoxie die mitochondriale ROS erhöht. Andere Studien wiesen hingegen einen ROS-Abfall unter Hypoxie nach (Fandrey, 1994; Kroll & Czyzyk-Kzeska, 1998; Görlach et al., 2003). Auch in PC12-Zellen stellen Mitochondrien die

Quelle der Hypoxie-induzierten ROS-Produktion dar (Höhler et al., 1999; Sell, 2001). Experimente verschiedener Arbeitsgruppen zeigten eine Bildung von ROS an Komplex I (Batandier et al., 2004) und Komplex III (Chandel et al., 2000; Chen et al., 2003). Die Arbeitsgruppe von Paddenberg et al. (2003a) demonstrierte an glatten Muskelzellen von Lungengefäßen Komplex II als Quelle der hypoxisch-induzierten ROS-Produktion in diesem Zelltyp. In PC12-Zellen wird bisher Komplex I (Sell, 2001) als mitochondriale Quelle der ROS-Produktion unter Hypoxie angenommen, aber auch eine partielle Mitbeteiligung von Komplex II (Täpper, 2005) konnte gezeigt werden.

Es wird angenommen, dass ROS als „second messenger“ adaptive und physiologische Reaktionen im Organismus induziert (Chandel und Schumacker, 1999; 2000). Demnach kommt den Mitochondrien neben ihrer wichtigen Stoffwechselfunktion außerdem eine große Bedeutung bei der lebensnotwendigen Erkennung von O_2-Schwankungen und die daran gekoppelte Aktivierung von Adaptionsmechanismen zu. Allerdings wurde hierzu auch eine Alternativhypothese aufgestellt, nach der die Mitochondrien nicht selbst den O_2-Sensor beherbergen, sondern durch ihren O_2-Verbrauch in der Atmungskette indirekt in den Sensormechanismus eingreifen (Doege et al., 2005; Wenger, 2005). Nach diesem Modell führt eine Hemmung der Atmungskette durch verminderten O_2-Verbrauch zu einer erhöhten O_2-Konzentration im Zytoplasma, weswegen der dort lokalisierten PHD wieder genügend O_2 zur Verfügung steht und HIF weiterhin hydroxyliert und abgebaut werden kann. So wird zwar durch Hemmung der Atmungskette die zelluläre Hypoxieantwort unterdrückt, der Sensor (PHD) liegt in diesem Modell aber außerhalb des Mitochondriums (Doege et al., 2005; Wenger, 2005).

1.7 Aufbau und Funktion des Mitochondriums

1.7.1 Äußere und innere Mitochondrienmembran

Mitochondrien besitzen zwei Membranen. Die glatte, äußere Membran ist reich an Porin, einem Transmembranprotein, das unspezifische Poren bildet und den Durchtritt von kleinen Molekülen und Ionen bis zu einer Größe von 5 kD ermöglicht (Loreta-Trull und Serrano, 1998). An die äußere Membran schließt sich die proteinreiche und stark gefaltete innere Mitochondrienmembran an. Enzyme und Redoxproteine, die den Elektronentransport und die oxidative Phosphorylierung katalysieren, sind in den als

Cristae bezeichneten Einstülpungen der inneren Membran lokalisiert (Loreta-Trull und Serrano, 1998). Die innere Membran ist für viele Metaboliten, polare Moleküle und die meisten Ionen aufgrund ihres hohen Gehalts an Cardiolipin (Capaldi, 1983; Hatefi, 1985; Loreta-Trull und Serrano, 1998) impermeabel. Nur Moleküle, für die spezielle Transportproteine vorhanden sind, sind durchlässig. Dies führt zu einer Abgrenzung und Isolierung des Mitochondriums vom Cytosol und ermöglicht den Aufbau eines elektrochemischen Potenzialgradienten über diese innere Membran (Loreta-Trull und Serrano, 1998).

1.7.2 Mitochondrienmatrix

Die innere Mitochondrienmembran umschließt die Matrix. Sie beinhaltet neben den löslichen Enzymen des oxidativen Stoffwechsels Substrate, Nucleotid-Kofaktoren sowie anorganische Ionen (Loreta-Trull und Serrano, 1998). Außerdem enthält die Matrix den genetischen Apparat der Mitochondrien, der eine Reihe verschiedener Mitochondrien-proteine synthetisiert (Capaldi, 1982).

1.7.3 Mitochondriale Atmungskette

Mitochondrien sind semiautonome Organellen, die wichtige Funktionen wie die Regulation des Zellstoffwechsels und des apoptotischen Zelltods erfüllen. Die Haupt-funktion der Mitochondrien liegt in der Energieproduktion in Form von Adenosin-5´-triphosphat (ATP) durch die oxidative Phosphorylierung aus Adenosin-5´-diphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (Chandel & Schumacker, 1999).
Die oxidative Phosphorylierung stellt einen Teil der in den Mitochondrien stattfindenden Atmungskette dar. 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 $FADH_2$, welche bei der Glykolyse der Fettsäureoxidation und dem Citratzyklus entstehen, über die Komplexe I, II, III und IV auf molekularen Sauerstoff übertragen. Energie, die dabei frei wird, 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 H_2O_2 und $O_2^{\cdot -}$ (Chance et al.,

1979; Papa und Skulachev, 1997). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten durch Untersuchungen zeigen, dass besonders den Komplexen II und III eine besondere Rolle in Bezug auf den Sauerstoffsensormechanismus zukommt. Turrens et al. (1985) zeigten, dass unter Normoxie ROS an Komplex III gebildet werden. Dabei dient Ubisemiquinon, einer von zwei mobilen Elektronencarriern der Atmungskette, als Elektronenquelle. Ubisemiquinon reduziert durch Abgabe von Elektronen O_2 zu O_2^-. 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. (2003a) konnte dahingegen den Komplex II als Quelle der hypoxisch induzierten ROS-Produktion in glatten Muskelzellen der Lungengefäße nachweisen.

1.8 Messung intrazellulärer ROS-Bildung

Die Bildung intrazellulärer ROS kann durch Fluoreszenzindikatoren nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Fluoreszenzindikatoren sollten dabei in der Lage sein, die Zellmembran zu penetrieren, um 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). Verschiedene Autoren berichteten, dass der farblose Fluoreszenzindikator Dihydro-rhodamin 123 (H_2R) für diesen Zweck gut geeignet sei. Die intrazellulär gebildeten ROS (v.a. H_2O_2) oxidieren die farblose Substanz zu ihrem fluoreszierenden Metaboliten 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). Mittels eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes kann die Fluoreszenzintensität des Indikators 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).

Es gibt unterschiedliche Meinungen bzgl. der Spezifität der ROS für die H_2R-Oxiation. Die Oxidation von H_2R durch H_2O_2 ist abhängig von speziellen Kofaktoren wie z.B. Peroxidasen, Cytochrom C oder Fe^{2+} (Royall et al., 1993; Le Bel et al., 1992; Hempel et

al., 1999; Lawrence et al., 2003; Burkitt et al., 2001). Kooy et al. (1994) sowie Crow (1997) konnten eine Oxidation von H_2R durch direkte Reaktion mit Peroxynitrit nachweisen. NO führt unter normoxischen Bedingungen zu einer langsamen Oxidation von H_2R, unter anaerobischen Bedingungen wird H_2R nicht oxidiert (Kooy et al., 1994). Andere Studien konnten nachweisen, dass $O_2^{\cdot -}$ und $OH^{\cdot}$ nicht bei der Oxidation von H_2R beteiligt sind (Henderson et al., 1993; Szabo et al., 1995; Gagnon et al., 1998; Winston et al., 1996). Die Spezifität des ROS-Nachweises durch H_2R in PC12-Zellen unter Hypoxie ist allerdings nicht genau untersucht worden.

1.9 Fragestellung und Ziel

Höhler et al. (1999; 2000) und Sell (2001) konnten in Hypoxieversuchen an PC12-Zellen zeigen, dass es unter Hypoxie zu einem Anstieg der ROS kommt. Ebenso konnten die Mitochondrien als Quelle der ROS ausfindig gemacht werden (Sell 2001; Täpper, 2005). In den durchgeführten Versuchen an PC12-Zellen wurde bisher jedoch noch nicht untersucht, welche ROS genau gebildet werden.

Um diese ungeklärte Frage zu beantworten, wurde in dieser Arbeit untersucht, welche ROS unter Hypoxie in PC12-Zellen der Ratte gebildet werden. Ebenfalls wurde die Spezifität des Fluoreszenzindikators H_2R für die ROS-Untersuchung untersucht. Zur genaueren Differenzierung der ROS wurden verschiedene Radikalfänger und Inhibitoren der ROS-Bildung eingesetzt.

Ebselen (EBS) ist ein Antioxidanz, welches an Peroxynitrit bindet und somit dessen Wirkung hemmt (Müller et al., 1985; Cotgreave et al., 1987). Dimethylthiourea (DMTU) ist ebenfalls ein Antioxidanz und wurde als OH-Radikalfänger eingesetzt (Fox, 1984). Katalase (KAT) ist ein Enzym, welches H_2O_2 durch Umwandlung zu H_2O und O_2 degradiert (Goldhaber et al., 1992). 1,10-Phenanthrolin (PHEN) ist ein Eisenchelator, welcher die Bildung von OH-Radikalen aus H_2O_2 verhindert (Van den Hoek et al., 1997). N-G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) wurde als NO-Synthasehemmer eingesetzt (Dwyer et al., 1991; Reif et Mc Creedy, 1995; Arzumanian et al., 2003). Als intrazellulärer H_2O_2-Fänger wurde Cysteamin (CYS) (Winterbourn et Metodiewa, 1999) eingesetzt und Nitroblautetrazolium (NBT) als intrazellulärer $O_2^{\cdot -}$-Fänger (Rook et al., 1985; Berridge et al., 2005) (s. Abb. 1).

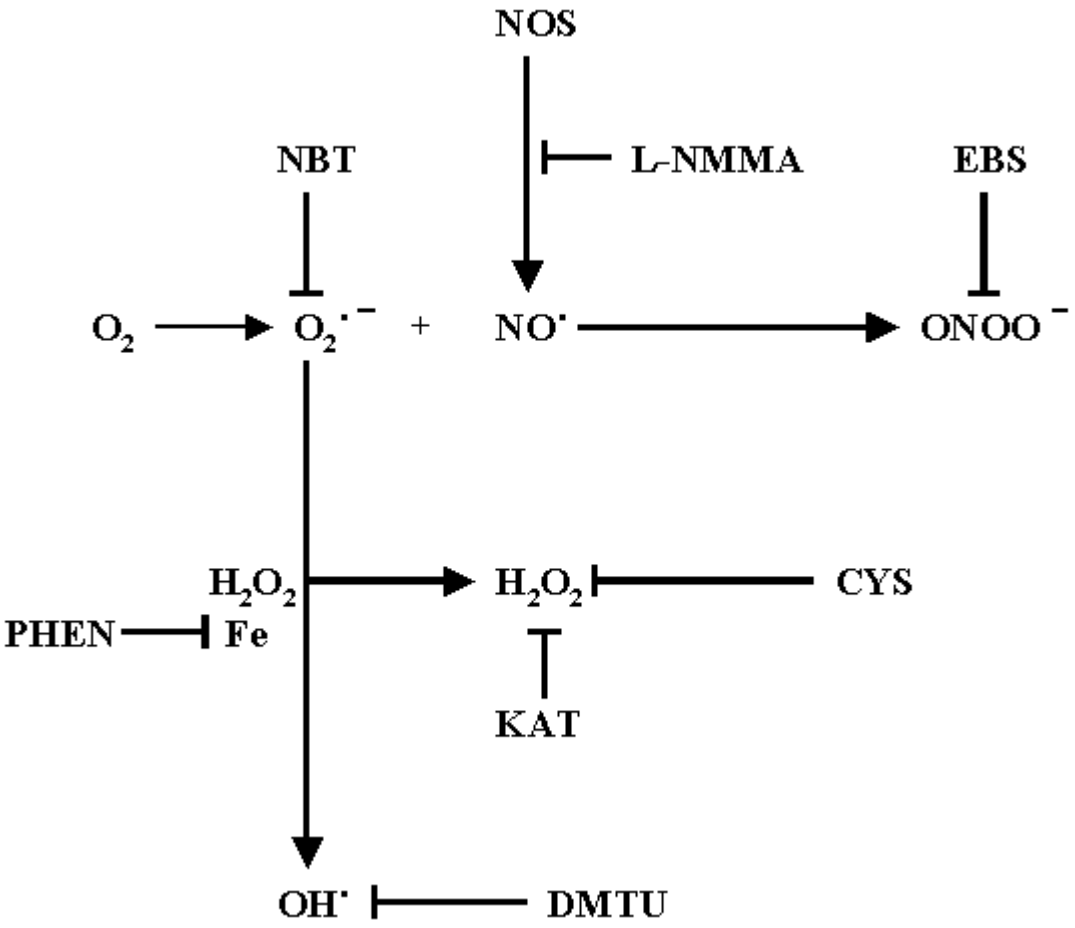

Abb. 1: Radikalfänger und Inhibitoren der ROS-Bildung

2. Material und Methodik

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinie

Für die Zellkultur wurden PC12-Zellen, eine Phäochromocytom-Zelllinie der Ratte (Greene und Tischler, 1976), aus der American Tissue Type Cell Collection (Rockville, MD, USA) verwendet.

2.1.2 Medium für PC12-Zellen

Zur Anzucht wurden 75 ml Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg, D) für 1 h mit fetalem Kälberserum (PAA, Marburg, D) beschichtet. Danach wurden die Zellen in RPMI 1640-Grundmedium (Sigma, Deisenhofen, D), das je 500 ml mit 25 ml fetalem Kälberserum, 50 ml Pferdeserum (Pan Systems, Aidenbach, D), 5 ml Streptomycin/Penicillin und 5 ml L-Glutamin (Biomol, Hamburg, D) angereichert wurde, suspendiert. Die PC12-Zellen wurden dreimal wöchentlich einem Mediumwechsel unterzogen und bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

2.1.3 Trypsinisieren (Splitten)

Die PC12-Zellen wurden nach 7-10 Tagen gesplittet. Hiefür wurden die adhärent wachsenden Zellen durch Zugabe von 3 ml Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst und 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert, um eine Mindestmenge von fünf Millionen Zellen pro Milliliter zu erhalten. Das entstandene Zellpellet wurde mit Hilfe einer silikonisierten Pasteurpipette mehrmals trituiert und dann im Verhältnis 1:3 auf neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium verteilt.

2.1.4 Einfrieren der PC12-Zellen

Beschriftete 1 ml fassende Kryo-Röhrchen wurden auf Eis vorgekühlt. Dem Kulturmedium wurde 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) zugesetzt. Anschliessend wurde

das Zellpellet im Einfriermedium resuspendiert und in die Kryoröhrchen portioniert. Die Kryoröhrchen wurden zunächst eine Stunde im Kühlschrank abgekühlt, danach für 12 Stunden in einer –20 °C Gefriertruhe zwischengelagert und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt (Haltbarkeit bis zu zwei Jahren).

2.1.5 Revitalisieren

Das Auftauen der Kryo-Röhrchen erfolgte in einem 37 °C warmen Wasserbad (B. Braun, Melsungen, D). Um die Bestandteile des Einfriermediums möglichst gründlich zu entfernen, wurde der Inhalt in 9 ml angewärmtes Kulturmedium pipettiert und 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit frischem Kulturmedium versetzt und in einer 75 ml Zellkulturflasche ausgesät. Anschließend wurden die Zellen wie üblich inkubiert.

2.1.6 Beschichtung der culture slides

Die culture slides (Falcon, Heidelberg, D, bestehend aus acht Näpfen) wurden mit FCS beschichtet. Nach 30 min wurde das FCS abgesaugt und in jeden Napf wurden 500 µl PC12-Zellmedium hinzugegeben. Die Anzahl der Zellen pro Napf betrug 30000.

2.2 Versuchsansatz und -durchführung

2.2.1 Aussaat der Zellen

12 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen im Kulturmedium auf vier culture slides (30000 Zellen/Napf) je Versuchsansatz ausgesät. Die Kammerung des Objektträgers in acht Näpfe ermöglichte die variable Kombination verschiedener Reagenzien an einem Versuchstag (Abb. 2).

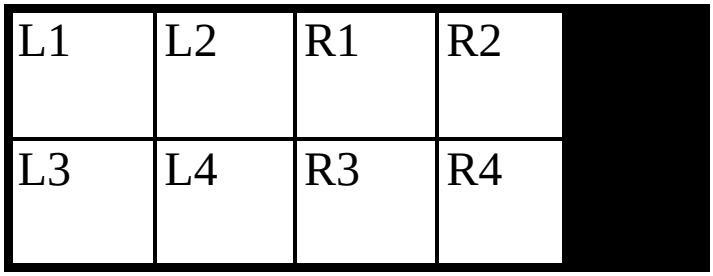

Abb. 2: Achtfache Kammerung eines Objektträgers für variable Substanzkombinationen (schematisch dargestellt).

2.2.2 Reagenzien

Vor Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium von den Näpfen der culture slides abgesaugt. In jeden Napf wurden anschließend 0,5 ml des jeweiligen Versuchsansatzes pipettiert. Abhängig vom Versuchsansatz wurden folgende Substanzen in unterschiedlicher Kombination und Anordnung in die Näpfe der culture slides eingebracht:

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle	Vehikel	Konzentration
Dihydrorhodamin 123	H_2R	Sigma, Deisenhofen, D	Locke`sche Lösung	25 µM
Ebselen	EBS	Alexis biochemicals, Grünberg, D	Locke`sche Lösung	2 µM
Dimethylthiourea	DMTU	Sigma	Locke`sche Lösung	5 mM
Katalase	KAT	Sigma	Locke`sche Lösung	1000 U/ml
1,10-Phenanthrolin	PHEN	Sigma	Locke`sche Lösung	10 µM
N-G-Monomethyl-L-Arginin	L-NMMA	Ultrafine Chemicals, Manchester, U.K.	Locke`sche Lösung	200 µM
Cysteamin	CYS	Sigma	Locke`sche Lösung	9,6 mM
Nitroblautetra-zolium	NBT	Sigma	Locke`sche Lösung	1 µM

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

2.2.3 Kombination der eingesetzten Substanzen

Fluoreszenzindikator	**Versuchsansatz + Experimentenzahl**					
	20 % O_2/ 1 % O_2	20 % O_2/ 1 % O_2 + EBS	20 % O_2/ 1 % O_2 + DMTU	20 % O_2/ 1 % O_2 + KAT	20 % O_2/ 1 % O_2 + PHEN	20 % O_2/ 1 % O_2 + L-NMMA
H_2R	35	5	5	5	5	5

Fluoreszenzindikator	**Versuchsansatz + Experimentenzahl**	
	20 % O_2/ 1 % O_2 + NBT	20 % O_2/ 1 % O_2 + CYS
H_2R	5	5

Tabelle 2: Kombination der eingesetzten Substanzen in unterschiedlichen Versuchsansätzen und Angabe der Anzahl der jeweilig durchgeführten Experimente bei PC12-Zellen.

2.2.4 Inkubation der Zellen

Zwei Objektträger wurden für eine Stunde unter normoxischen Bedingungen (Raumluft, 20 % O_2) inkubiert. Die beiden anderen Objektträger wurden in einer abgedichteten Plastikbox mit einem Volumen von 300 ml unter hypoxischen Bedingungen (1 % O_2) inkubiert. Hierfür wurde über eine Schlauchkonstruktion im Deckel der Plastikbox ein Festgasgemisch, bestehend aus 1 % O_2, 5 % CO_2 und N_2 als Balance, aus einer Gasflasche (Messer-Griesheim, Duisburg, D) kontinuierlich in die Box geleitet.

Nach 60 Minuten wurden alle Objektträger mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (siehe Rezepturen eingesetzter Lösungen) fixiert. Das Plastikgefäß wurde über eine weitere Öffnung im Deckel mit Hilfe eines Injektionssystems mit dem Fixiermittel

geflutet, um die Zellen vor einer Reoxygenierung zu fixieren. Nach zehn Minuten wurde die Fixierung der Zellen und des Fluoreszenzindikators abgeschlossen.

Nach der Fixierung wurden die Zellen zur Entfernung des überschüssigen Fluoreszenzindikators und des Fixiermittels zweimal fünf Minuten mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und mit gepuffertem Glycerol (siehe Rezepturen eingesetzter Lösungen) als Eindeckmedium eingedeckt. Um einer temperaturbedingten Radikalbildung vorzubeugen, wurden die Objektträger während der Messungen bei 4 °C aufbewahrt.

2.3 ROS-Messungen

2.3.1 Laserscanning

Es wurde ein Laser Scan Mikroskop (LSM 10, Zeiss, Jena, D) im nicht-konfokalen Modus benutzt, um die Fluoreszenzintensität zu messen. Die Laserwellenlänge betrug 488 nm. Es wurde das 40er Objektiv mit zweifacher Nachvergrößerung (Zoom) benutzt. Die Fluoreszenz wurde möglich durch die Reaktion des Indikators: $H_2R \rightarrow$ Rhodamin 123. An jedem Versuchstag wurden zu Beginn der Messungen der Kontrast und die Helligkeit separat für den Fluoreszenzindikator neu eingestellt. Dafür wurden alle vier Objektträger kurzzeitig gescannt und geeignete Kontrast- und Helligkeitswerte ermittelt, die sowohl bei Objektträgern mit sehr hoher als auch mit sehr niedriger Fluoreszenzintensität eine Auswertung ermöglichten. Die Scanzeit betrug 32 Sekunden.

2.3.2 Messvorgang

Die Näpfe wurden im Transmissionsmodus kurz betrachtet, um geeignete Zellen auszuwählen. Gewählt wurden Zellen, die sich in der Mitte der Näpfe befanden und nicht übereinander lagen. Von jedem Napf wurden die Fluoreszenzintensitäten von 10 Zellen gemessen. Die ermittelten Werte für die Fluoreszenzintensität wurden in Graustufen auf einer Skala von 0-255 wiedergegeben.

2.3.3 Messreihenfolge

An einem Versuchstag wurden vier mit Buchstaben kodierte Objektträger blind analysiert. Die kodierten Objektträger wurden in definierter gleicher Reihenfolge durchgemustert, um alle Näpfe während der Messungen den gleichen Licht- und Temperaturbedingungen auszusetzen. Während des Messvorganges wurden die Objektträger mit Hilfe eines Kühlaggregats auf 4 °C abgekühlt, um weitere Radikalbildungen zu minimieren. Die Messungen erfolgten nach dem Schema: AL1-DL1, AR1-DR1, AL2-DL2, AR2-DR2, AL3-DL3, AR3-DR3, AL4-DL4, AR4-DR4 (vgl. Abb. 2).

2.4 Statistische Auswertung

Die Daten eines jeden Versuchstages wurden mit den nicht-parametrischen Tests nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 9.0 analysiert. Es wurden Einzelvergleiche durch Testung auf kritische Rangsummen-differenzen durchgeführt (Bortz und Lienert, 1998). Die Medianwerte der einzelnen Gruppen eines Versuchstages wurden in eine übergeordnete Tabelle zur weiteren Auswertung überführt. Hierbei wurde für nicht-signifikante Werte der unterschiedlichen Gruppen der jeweils gleiche Wert (Mittelwert der einzeln errechneten Mediane) eingesetzt. Beobachtete Differenzen wurden bei $p \leq 0{,}05$ als signifikant eingestuft. In dieser übergeordneten Tabelle wurden die Werte eines Versuchstages als gepaart betrachtet. Entsprechend erfolgte die weitere statistische Auswertung mit den nicht-parametrischen Tests für abhängige Stichproben nach Friedman und Wilcoxon.

2.5 Rezepturen eingesetzter Lösungen

<u>Phosphatpuffer</u>

Lösung A: 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (31,2 g/L) (Merck, D)
Lösung B: 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (35,6 g/L) (Merck)
Mischverhältnis: 230 ml Lösung A mit 770 ml Lösung B, pH 7,4

Gepuffertes Glycerol

Pufferlösungherstellung aus einer Mischung von 50 ml Natriumhydrogencarbonat (Merck) mit 0,5 M Dinatriumcarbonat (Merck) bei einem pH-Wert von 8,6. Mischung des Glycerols (Merck) mit Puffer im Verhältnis 2:1.

Fixationslösung

40 g Paraformaldehyd werden in 500 ml Aqua dest. langsam auf 70 °C erhitzt. Zugabe von einigen Tropfen 2 M NaOH bis die Lösung klar wird. Nach dem Erkalten lassen Zugabe von 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer. Anschließende Einstellung des pH-Wertes auf 7,2-7,4. Danach membranfiltrieren (3 µm Porengröße) und Lagerung bei -20 °C.

Locke`sche Lösung

Ansatz für 125 ml:
0,34 g Natriumchlorid
+ 0,51 g Hepes (Sigma)
+ 0,44 g Saccharose (Merck)
+ 0,13 g Glucose in 125 ml Aqua dest.
Einstellung des pH-Wertes auf 7,28. Anschließende Zugabe von 0,039 g Calciumchlorid (Merck) und Filtrierung mit 0,2 µm Membranen. Lagerung bei –20 °C.

3. Ergebnisse

3.1 Normoxie-/Hypoxieversuche unter Kontrollbedingungen bei PC12-Zellen

In insgesamt 35 Kontrollversuchen wurde bei PC12-Zellen unter Verwendung von H_2R die Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie und Hypoxie verglichen. Es konnte bei allen Messungen ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität, d.h. der ROS-Bildung, unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden (Abb. 3, 4 und 5).

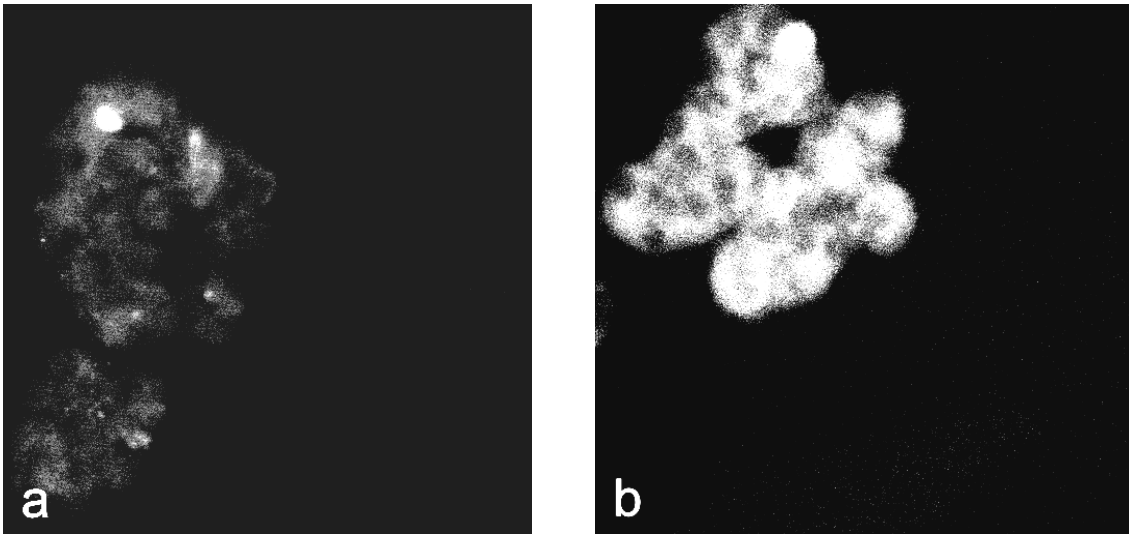

Abb. 3a: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2).
Abb. 3b: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1 % O_2).

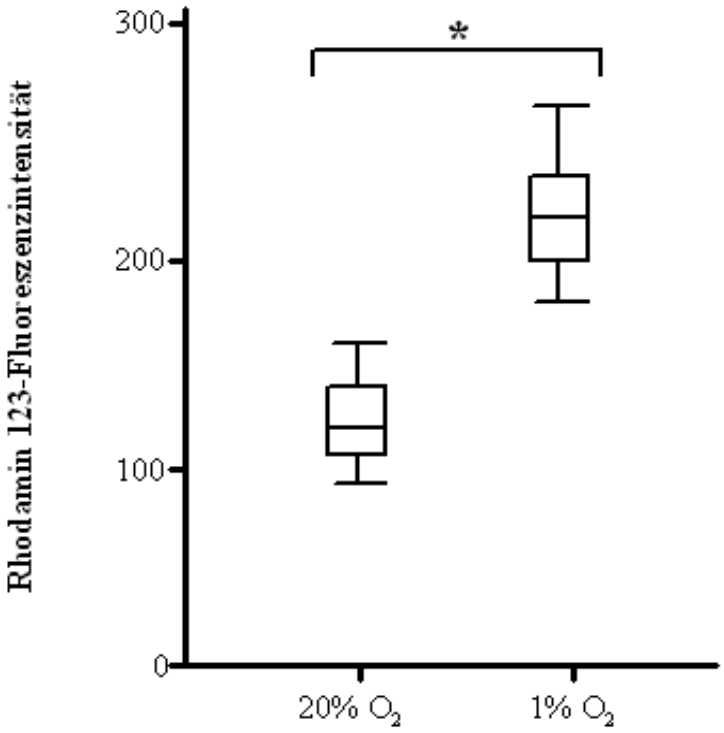

Abb. 4: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75 der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität eines Versuchstages bei PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80). * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

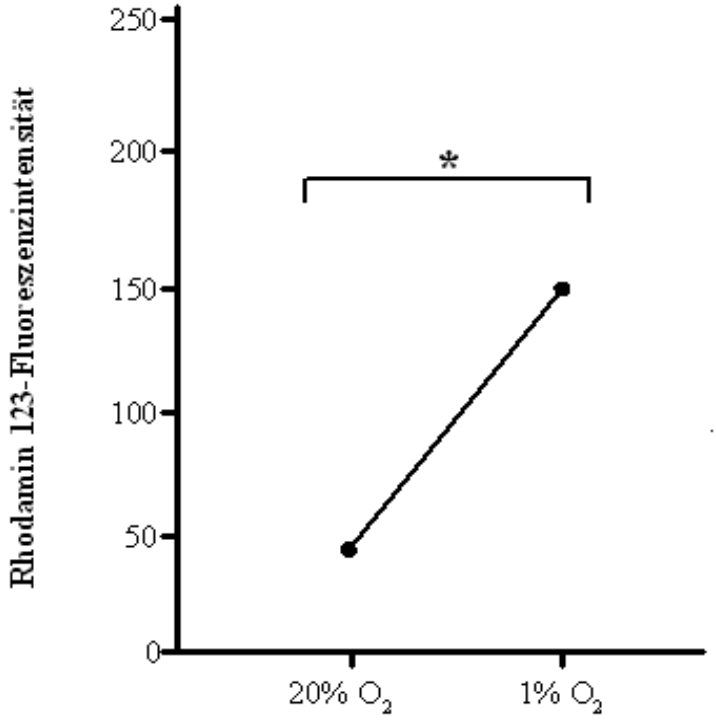

Abb. 5: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität eines Versuchstages nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) bei PC12-Zellen. Jeder Punkt gibt den ermittelten Medianwert eines Versuchstages wieder. * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

3.2 Normoxie-/Hypoxieversuche nach EBS-Exposition bei PC12-Zellen

Um den Einfluss von EBS auf die Fluoreszenzintensität zu überprüfen, wurden PC12-Zellen für eine Stunde unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen in Gegenwart von EBS (2 µM) inkubiert. Unter Zugabe von EBS kam es bei PC12-Zellen zu einer signifikanten hypoxiebedingten Zunahme der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität (Abb. 6, 7 und 8).

Die Messergebnisse von EBS-behandelten PC12-Zellen und unbehandelten Kontrollzellen wiesen nach Inkubation unter Normoxie und Hypoxie keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 7, 9 und Tabelle 3).

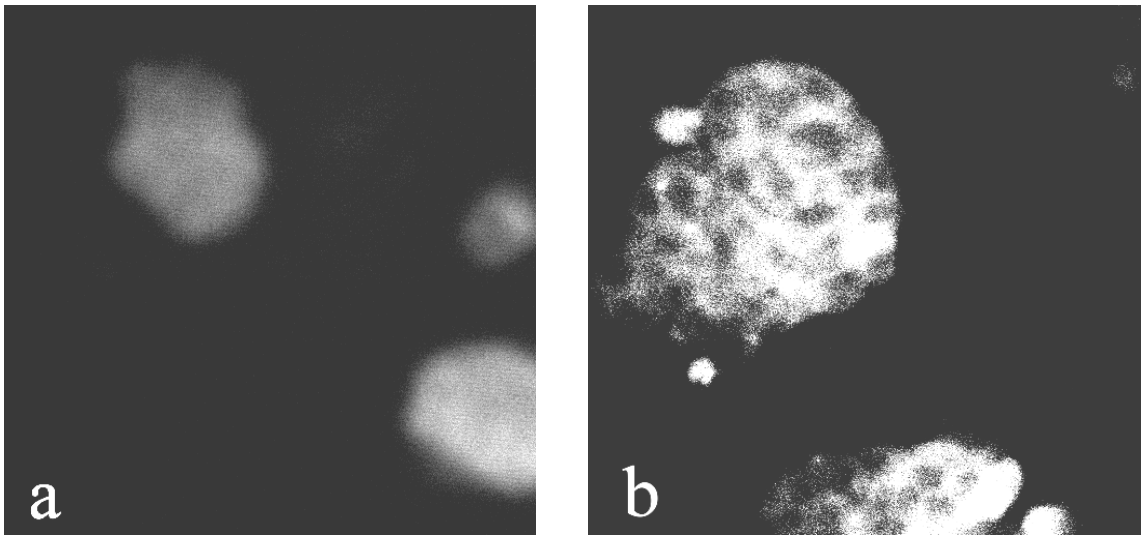

Abb. 6a: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2) und EBS-Zugabe.
Abb. 6b: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1 % O_2) und EBS-Zugabe.

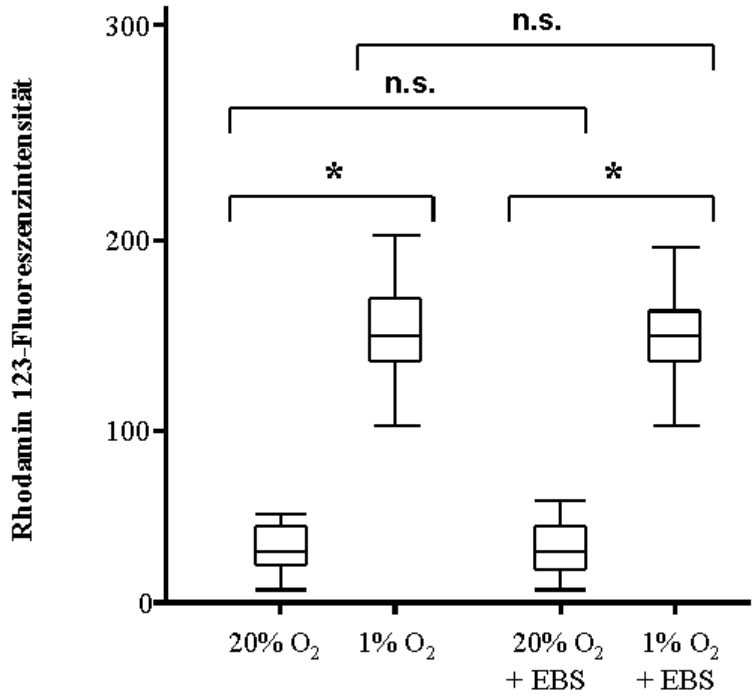

Abb. 7: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75 der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität eines Versuchstages bei Kontrollzellen und EBS-inkubierten Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80). * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

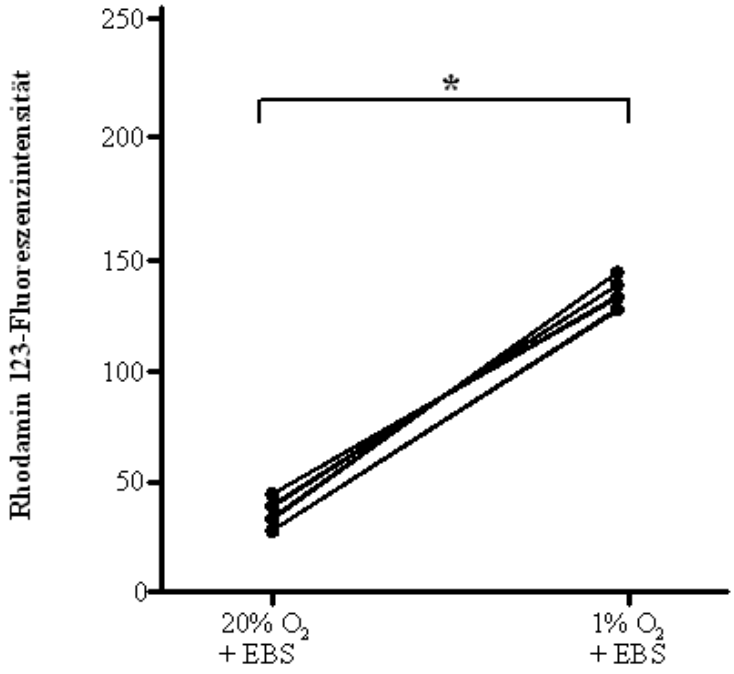

Abb. 8: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) unter EBS-Zugabe. Jeder Punkt gibt den ermittelten Medianwert eines Versuchstages wieder. * kennzeichnet Unterschiede mit p<0,05.

20 % O_2	1 % O_2	20 % O_2 + EBS	1 % O_2 + EBS
28	142	32	139
35	148	34	147
32	152	32	140
21	168	22	149
34	135	40	153

Tabelle 3: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach EBS-Zugabe.

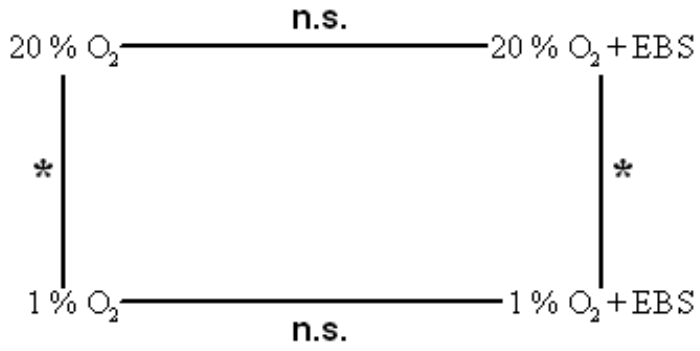

Abb. 9: Statistisch gesicherte Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach EBS-Zugabe. * kennzeichnet Unterschiede mit p<0,05; n.s. kennzeichnet Unterschiede mit p>0,05.

3.3 Normoxie-/Hypoxieversuche nach DMTU-Exposition bei PC12-Zellen

Um den Einfluss von DMTU auf die Fluoreszenzintensität zu überprüfen, wurden PC12-Zellen für eine Stunde unter hypoxischen (1 % O_2) und normoxischen (20 % O_2) Bedingungen in Gegenwart von DMTU (5 mM) inkubiert. Unter Zugabe von DMTU kam es bei PC12-Zellen zu einer signifikanten hypoxiebedingten Zunahme der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität (Abb. 10, 11 und 12).

Die Messergebnisse von DMTU-behandelten Zellen und Kontrollen wiesen nach Inkubation unter Normoxie keine signifikanten Unterschiede auf. Auch nach Inkubation unter hypoxischen Konditionen war der Unterschied nicht signifikant (Abb. 11, 13 und Tabelle 4).

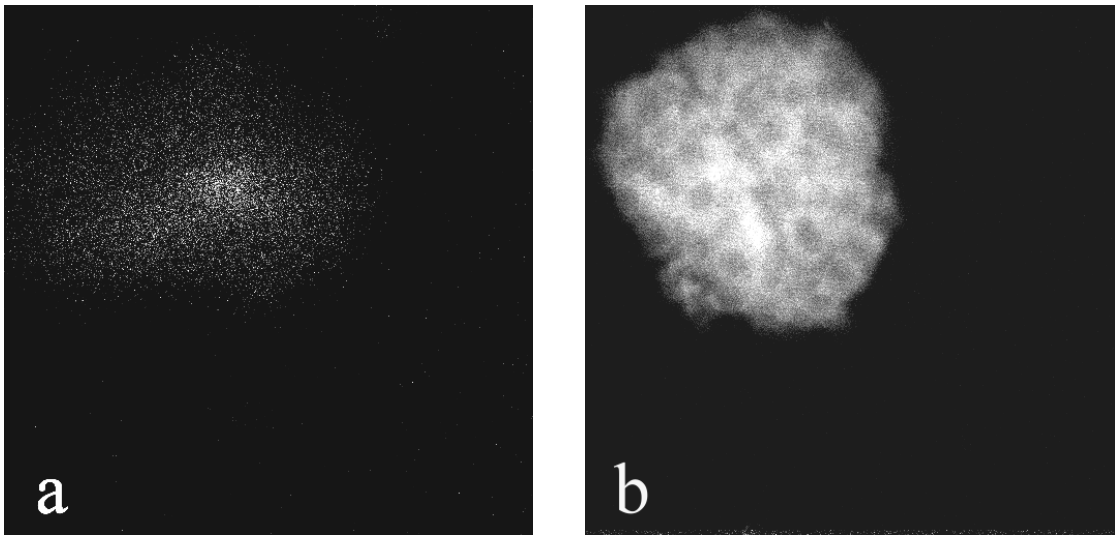

Abb. 10a: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2) und DMTU-Zugabe.
Abb. 10b: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1 % O_2) und DMTU-Zugabe.

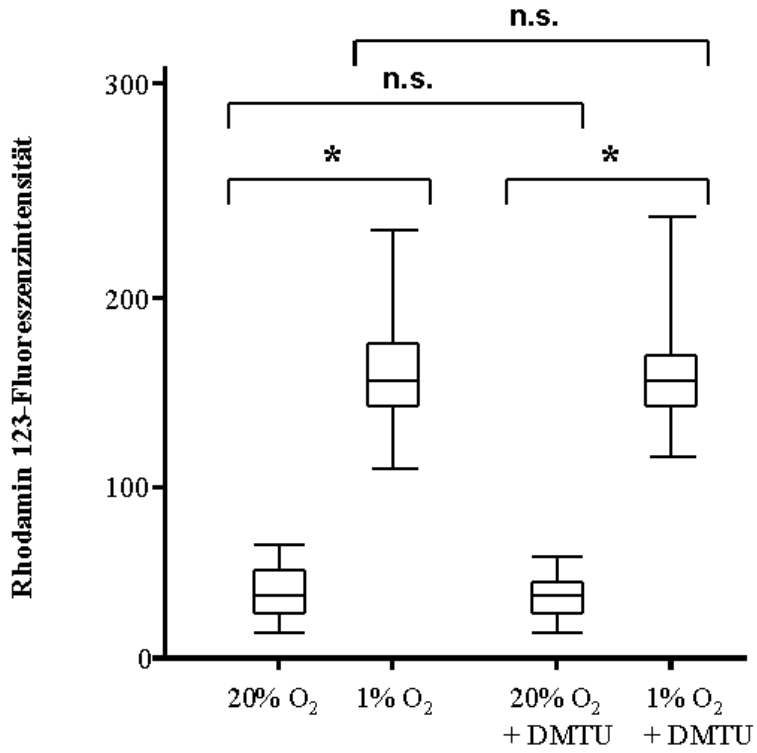

Abb. 11: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75 der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität eines Versuchstages bei Kontrollzellen und DMTU-inkubierten Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80). * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

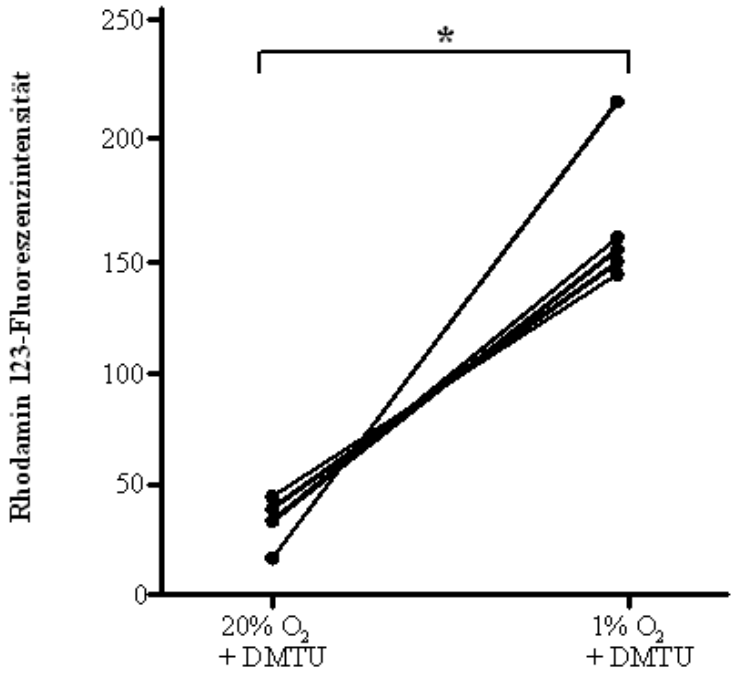

Abb. 12: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) unter DMTU-Zugabe. Jeder Punkt gibt den ermittelten Medianwert eines Versuchstages wieder. * kennzeichnet Unterschiede mit p<0,05.

20 % O_2	1 % O_2	20 % O_2 + DMTU	1 % O_2 + DMTU
47	171	41	156
26	194	15	212
35	148	34	147
40	152	37	151
26	145	28	144

Tabelle 4: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach DMTU-Zugabe.

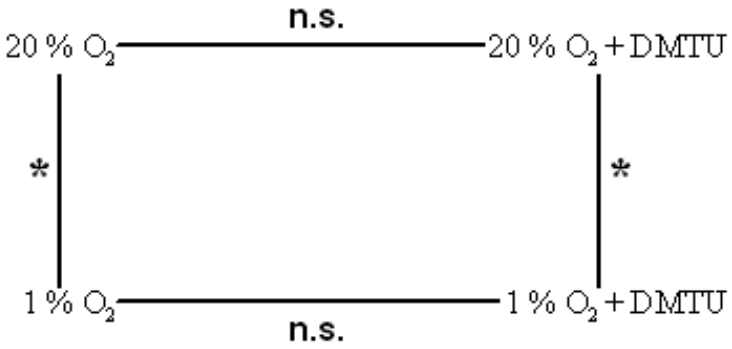

Abb. 13: Statistisch gesicherte Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach DMTU-Zugabe. * kennzeichnet Unterschiede mit p<0,05; n.s. kennzeichnet Unterschiede mit p>0,05.

3.4 Normoxie-/Hypoxieversuche nach KAT-Exposition bei PC12-Zellen

Um den Einfluss von KAT auf die Fluoreszenzintensität zu überprüfen, wurden PC12-Zellen für eine Stunde unter hypoxischen (1 % O_2) und normoxischen (20 % O_2) Bedingungen in Gegenwart von KAT (1000 U/ml) inkubiert. Unter Zugabe von KAT kam es bei PC12-Zellen zu einer signifikanten hypoxiebedingten Zunahme der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität (Abb. 14, 15 und 16).

Die Messergebnisse von KAT-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollen wiesen nach Inkubation unter Normoxie keinen signifikanten Unterschied auf. Auch nach Inkubation unter hypoxischen Konditionen war kein signifikanter Unterschied zu beobachten (Abb. 15, 17 und Tabelle 5).

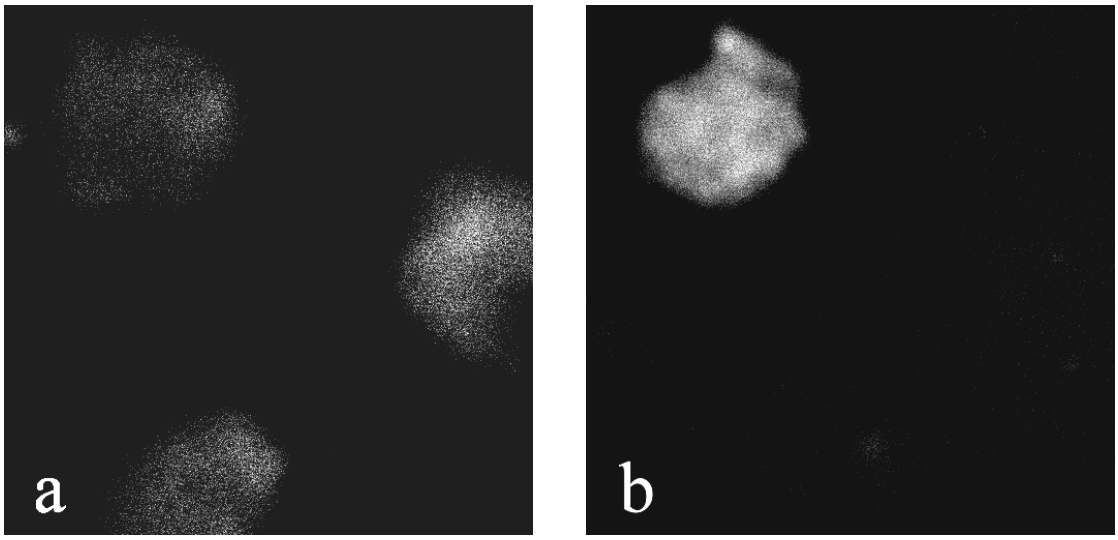

Abb. 14a: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (20 % O_2) und KAT-Zugabe.
Abb. 14b: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1 % O_2) und KAT-Zugabe.

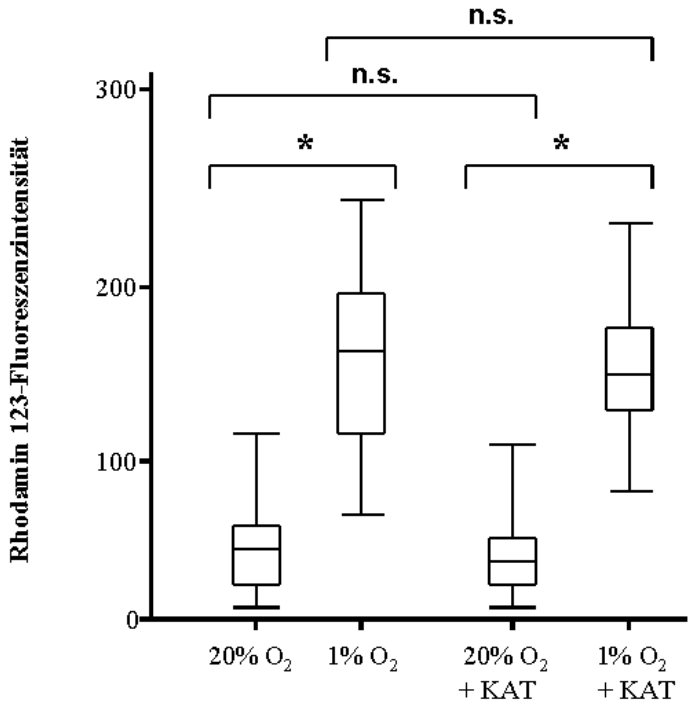

Abb. 15: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75 der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität eines Versuchstages bei Kontrollzellen und KAT-inkubierten Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80). * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

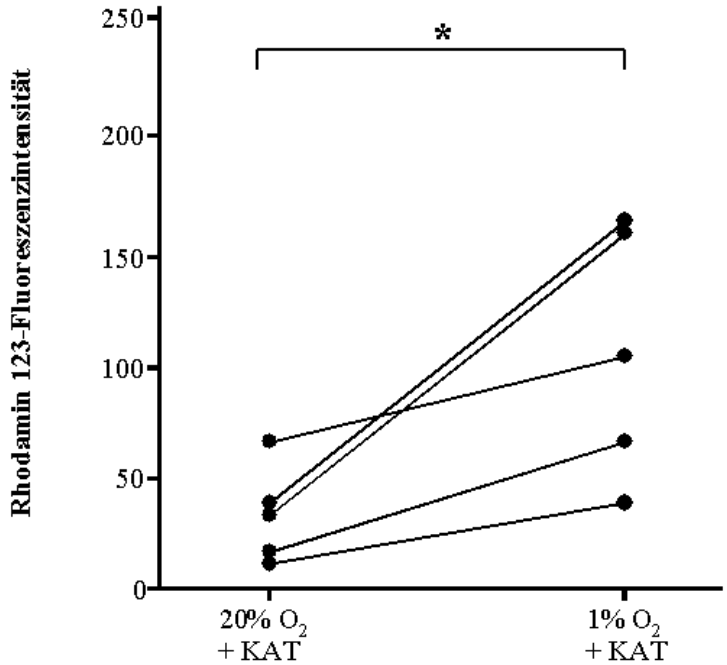

Abb. 16: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) unter KAT-Zugabe. Jeder Punkt gibt den ermittelten Medianwert eines Versuchstages wieder. * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

20 % O_2	1 % O_2	20 % O_2 + KAT	1 % O_2 + KAT
47	94	13	39
54	197	41	158
9	36	16	56
54	144	71	103
45	166	34	152

Tabelle 5: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach KAT-Zugabe.

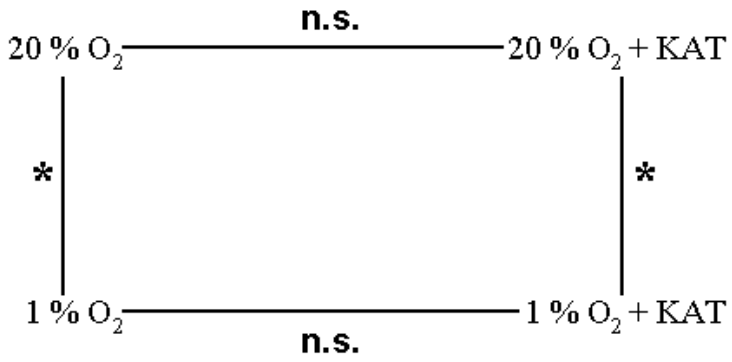

Abb. 17: Statistisch gesicherte Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach KAT-Zugabe. * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

3.5 Normoxie-/Hypoxieversuche nach PHEN-Exposition bei PC12-Zellen

Um den Einfluss von PHEN auf die Fluoreszenzintensität zu überprüfen, wurden PC12-Zellen für eine Stunde unter hypoxischen (1 % O_2) und normoxischen (20 % O_2) Bedingungen in Gegenwart von PHEN (10 µM) inkubiert. Nach Zugabe von PHEN war unter Hypoxie eine Tendenz zu höheren Werten zu beobachten, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ausgeprägt (Abb. 18, 19a und 20). Nur in einem einzelnen Experiment wurde unter Normoxie eine höhere Fluoreszenzintensität gemessen als unter Hypoxie (Abb. 19b, 20 und Tabelle 6).

Im Vergleich zu Kontrollen wiesen PHEN-behandelte Zellen nach Inkubation unter normoxischen Konditionen keinen signifikanten Unterschied in der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität auf. Auch unter Hypoxie wiesen die Zellen keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 19a, 21 und Tabelle 6). Nur in einem Versuch wiesen PHEN-behandelte Zellen im Vergleich zu den Kontrollen unter normoxischen und hypoxischen Konditionen einen signifikanten Unterschied auf (Abb. 19b, Tabelle 6).

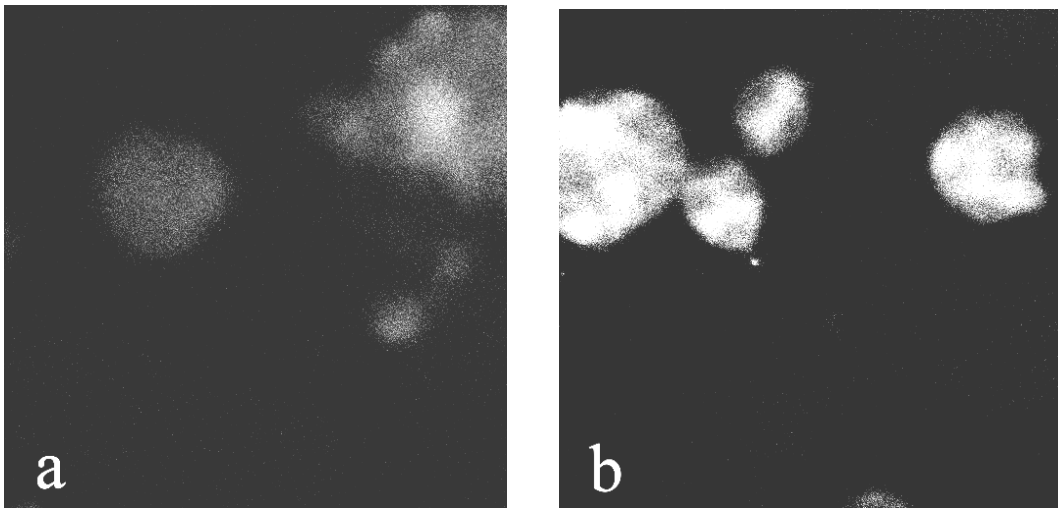

Abb. 18a: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2) und PHEN-Zugabe.
Abb. 18b: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1 % O_2) und PHEN-Zugabe.

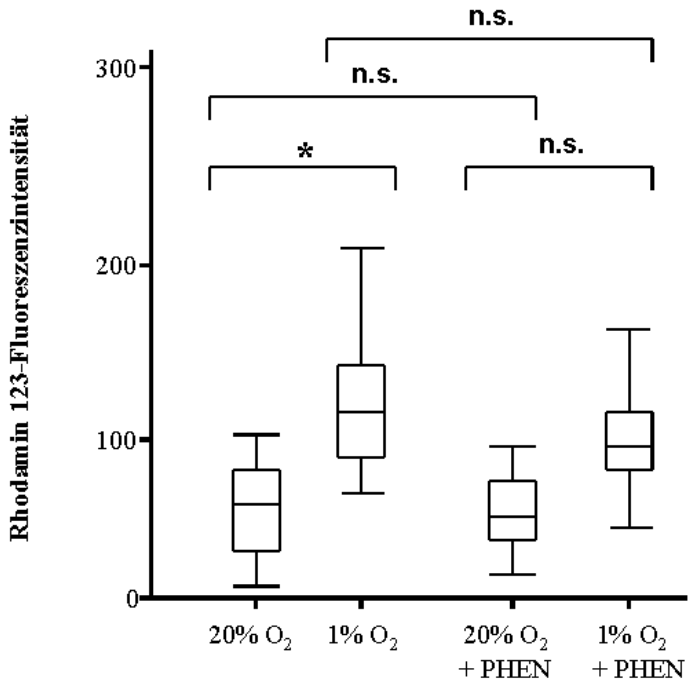

Abb. 19a: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75 der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität eines Versuchstages bei Kontrollzellen und PHEN-inkubierten Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80). * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$; n.s. kennzeichnet Unterschiede mit $p>0,05$.

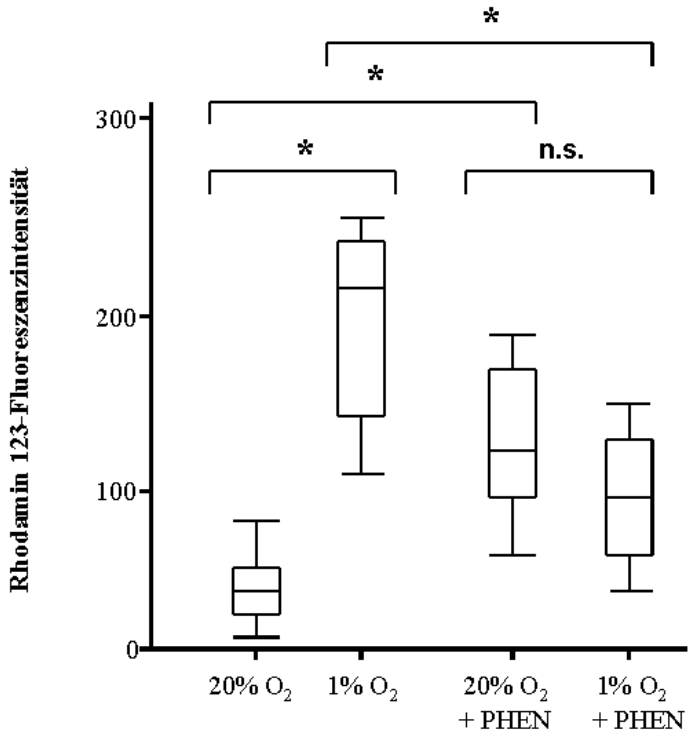

Abb. 19b: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75 der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität eines anderen als in Abb. 18a dargestellten Versuchstages bei Kontrollzellen und PHEN-inkubierten Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80). * kennzeichnet Unterschiede mit p<0,05; n.s. kennzeichnet Unterschiede mit >0,05.

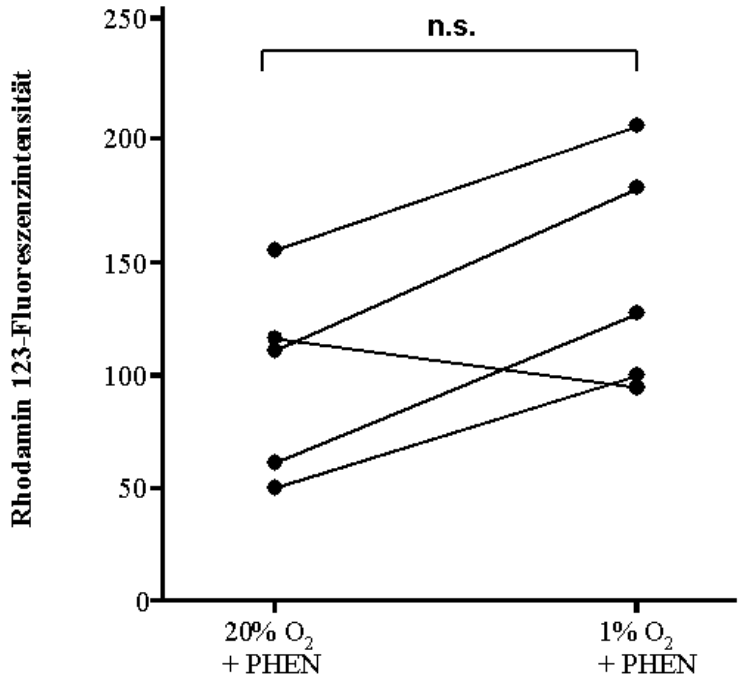

Abb. 20: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) und PHEN-Zugabe. Jeder Punkt gibt den ermittelten Medianwert eines Versuchstages wieder; n.s. kennzeichnet Unterschiede mit p>0,05.

20 % O_2	1 % O_2	20 % O_2 + PHEN	1 % O_2 + PHEN
88	147	153	205
55	125	56	135
54	109	51	94
146	181	116	164
38	224	124	98

Tabelle 6: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2) und Hypoxie (1 % O_2) in Kontrollen und nach PHEN-Zugabe.

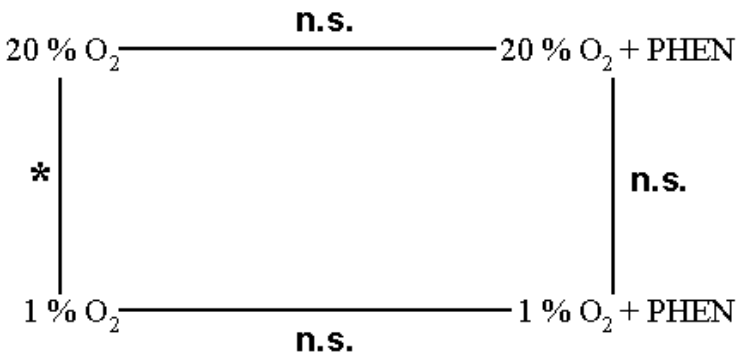

Abb. 21: Statistisch gesicherte Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach PHEN-Zugabe. * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$; n.s. kennzeichnet Unterschiede mit $p>0,05$.

3.6 Normoxie-/Hypoxieversuche nach L-NMMA-Exposition bei PC12-Zellen

Um den Einfluss von L-NMMA auf die Fluoreszenzintensität zu überprüfen, wurden PC12-Zellen für eine Stunde unter hypoxischen (1 % O_2) und normoxischen (20 % O_2) Bedingungen in Gegenwart von L-NMMA (200 µM) inkubiert. Auch unter Zugabe von L-NMMA kam es bei PC12-Zellen zu einer signifikanten Hypoxie-bedingten Zunahme der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität (Abb. 22, 23 und 24).

Die Messergebnisse von L-NMMA-behandelten Zellen und Kontrollen wiesen sowohl nach Inkubation unter Hypoxie als auch unter Normoxie keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 23, 25 und Tabelle 7).

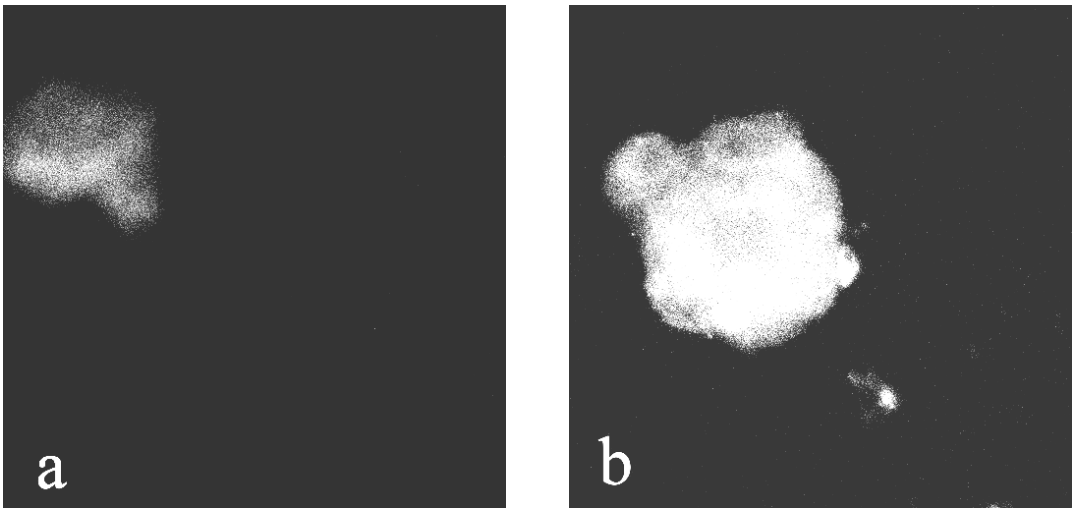

Abb. 22a: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2) und L-NMMA-Zugabe.

Abb. 22b: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1 % O_2) und L-NMMA-Zugabe.

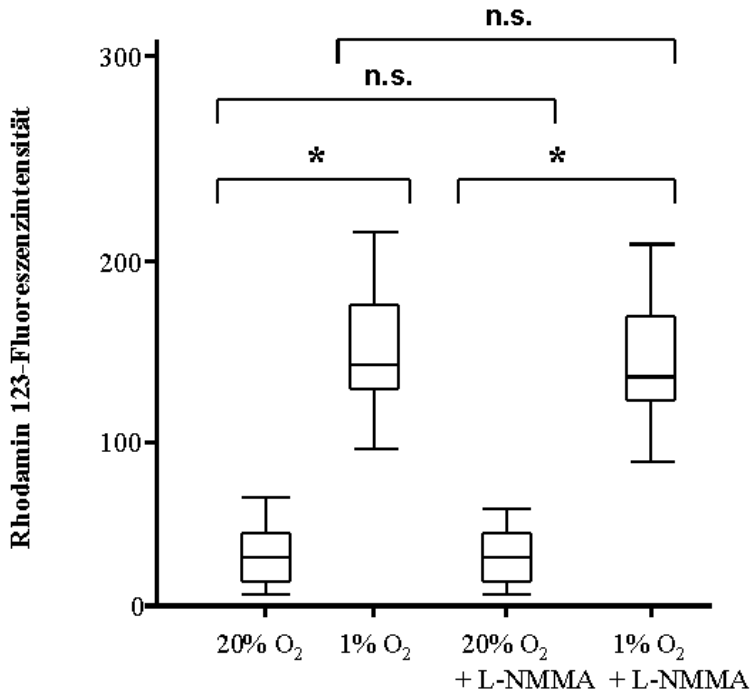

Abb. 23: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75 der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität eines Versuchstages bei Kontrollzellen und L-NMMA-inkubierten Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80). * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

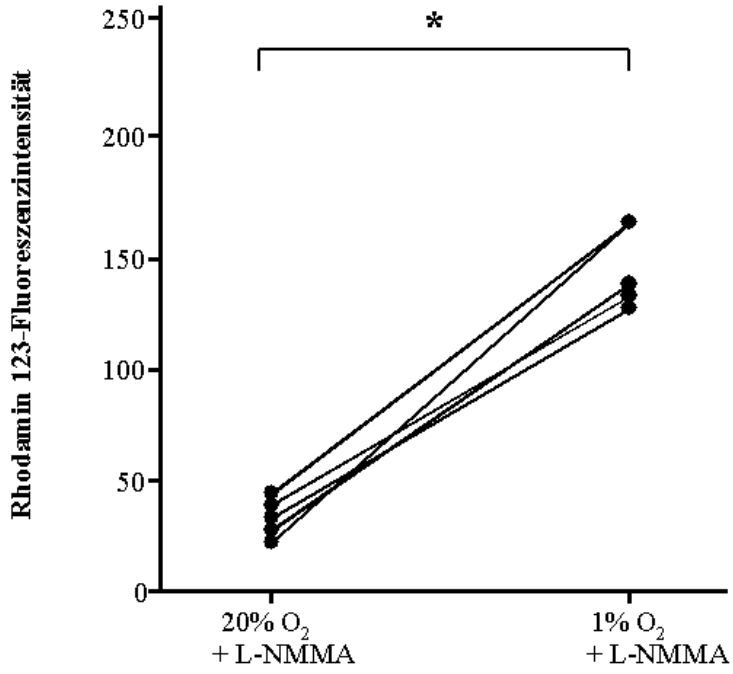

Abb. 24: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) unter L-NMMA-Zugabe. Jeder Punkt gibt den ermittelten Medianwert eines Versuchstages wieder. * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

20 % O_2	1 % O_2	20 % O_2 + L-NMMA	1 % O_2 + L-NMMA
35	131	37	120
53	140	49	157
45	128	44	131
25	166	20	160
32	146	27	140

Tabelle 7: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach L-NMMA-Zugabe.

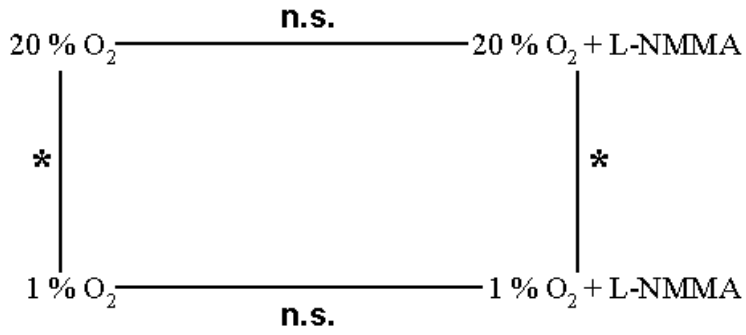

Abb. 25: Statistisch gesicherte Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach L-NMMA-Zugabe. * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$; n.s. kennzeichnet Unterschiede mit $p>0,05$.

3.7 Normoxie-/Hypoxieversuche nach CYS-Exposition bei PC12-Zellen

Um den Einfluss von CYS auf die Fluoreszenzintensität zu überprüfen, wurden PC12-Zellen für eine Stunde unter hypoxischen (1 % O_2) und normoxischen (20 % O_2) Bedingungen in Gegenwart von CYS (9,6 mM) inkubiert. Bei CYS-Zugabe kam es bei PC12-Zellen ebenfalls zu einer signifikanten Hypoxie-bedingten Zunahme der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität (Abb. 26, 27 und 28).

Die Messergebnisse von CYS-behandelten Zellen und Kontrollen wiesen nach Inkubation unter Normoxie keinen signifikanten Unterschied auf. Unter hypoxischen Bedingungen war der Unterschied jedoch signifikant (Abb. 27 und Tabelle 8, Abb. 29). Der Hypoxie-bedingte Fluoreszenzanstieg war in CYS-behandelten Zellen geringer als in Kontrollen (Abb. 27 und Tabelle 8).

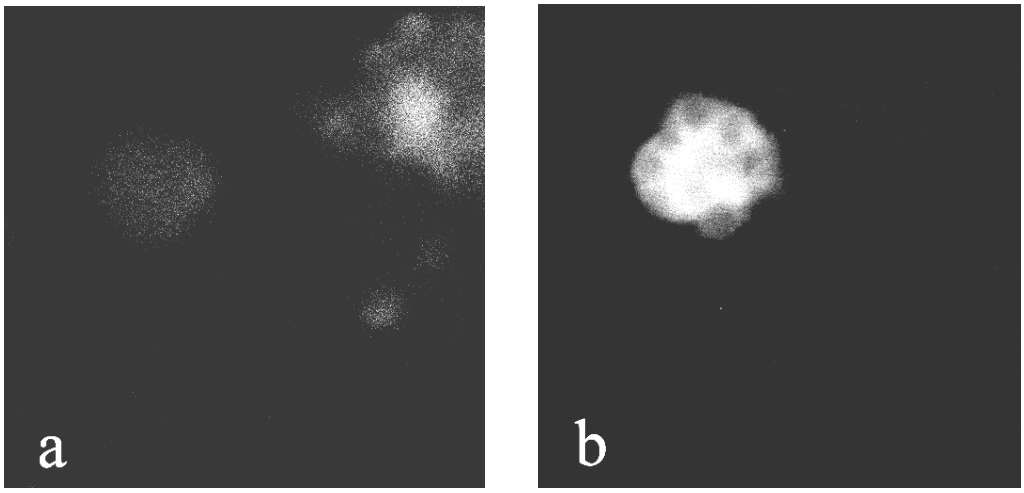

Abb. 26a: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2) und CYS-Zugabe.
Abb. 26b: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1 % O_2) und CYS-Zugabe.

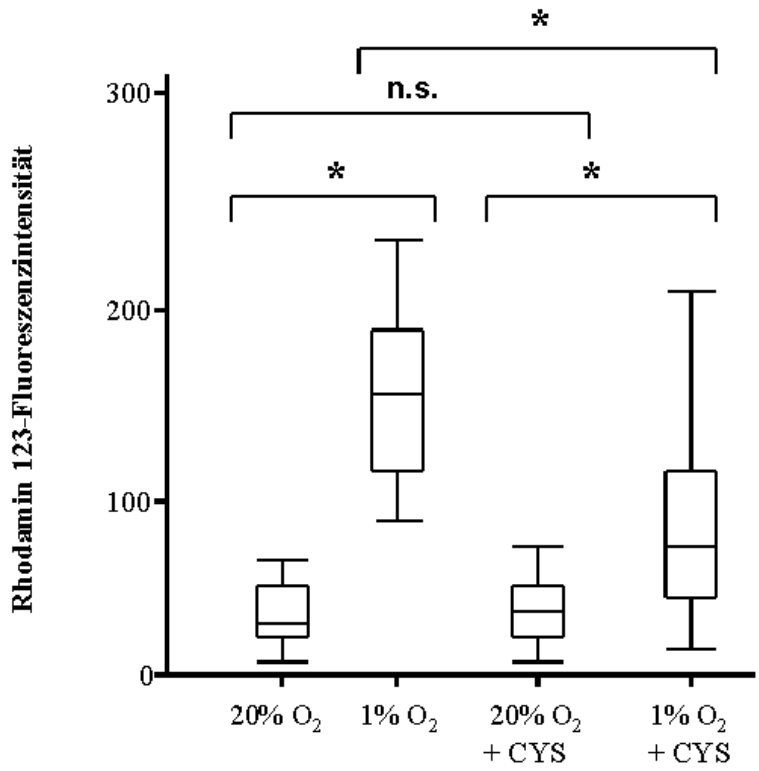

Abb. 27: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75 der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität eines Versuchstages bei Kontrollzellen und CYS-inkubierten Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80). * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

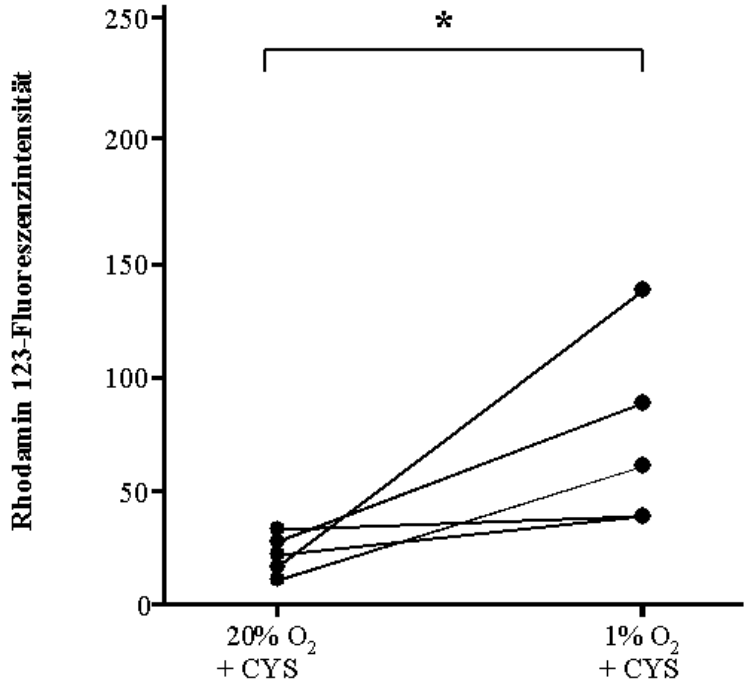

Abb. 28: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) unter CYS-Zugabe. Jeder Punkt gibt den ermittelten Medianwert eines Versuchstages wieder. * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

20 % O_2	1 % O_2	20 % O_2 + CYS	1 % O_2 + CYS
24	135	23	40
20	165	27	81
24	197	19	140
25	181	29	40
14	142	16	54

Tabelle 8: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach CYS-Zugabe.

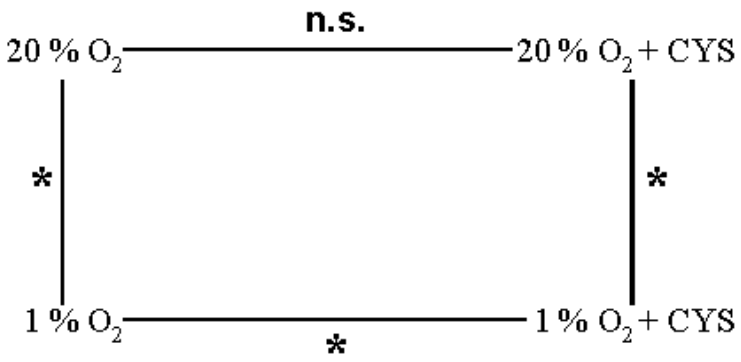

Abb. 29: Statistisch gesicherte Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach CYS-Zugabe. * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$.

3.8 Normoxie-/Hypoxieversuche nach NBT-Exposition bei PC12-Zellen

Um den Einfluss von NBT auf die Fluoreszenzintensität zu überprüfen, wurden PC12-Zellen für eine Stunde unter hypoxischen (1 % O_2) und normoxischen (20 % O_2) Bedingungen in Gegenwart von NBT (1 µM) inkubiert. Nach NBT-Zugabe kam es bei PC12-Zellen zu keiner signifikanten Hypoxie-bedingten Zunahme der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität (Abb. 30, 31 und 32).

Die Messergebnisse von NBT-behandelten Zellen und Kontrollen wiesen nach Inkubation unter Normoxie einen signifikanten Unterschied auf. Auch unter Hypoxie war der Unterschied signifikant. Die Fluoreszenzintensität von NBT-behandelten Zellen war jeweils geringer (Abb. 31, 33 und Tabelle 9).

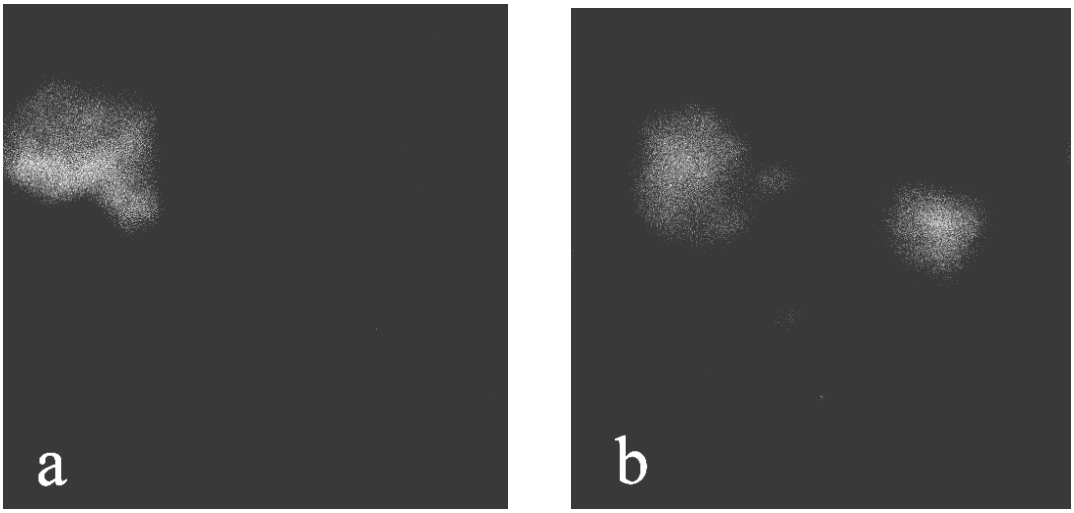

Abb. 30a: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2) und NBT-Zugabe.
Abb. 30b: LSM-Darstellung der PC12-Zellen nach einstündiger Hypoxie (1 % O_2) und NBT-Zugabe.

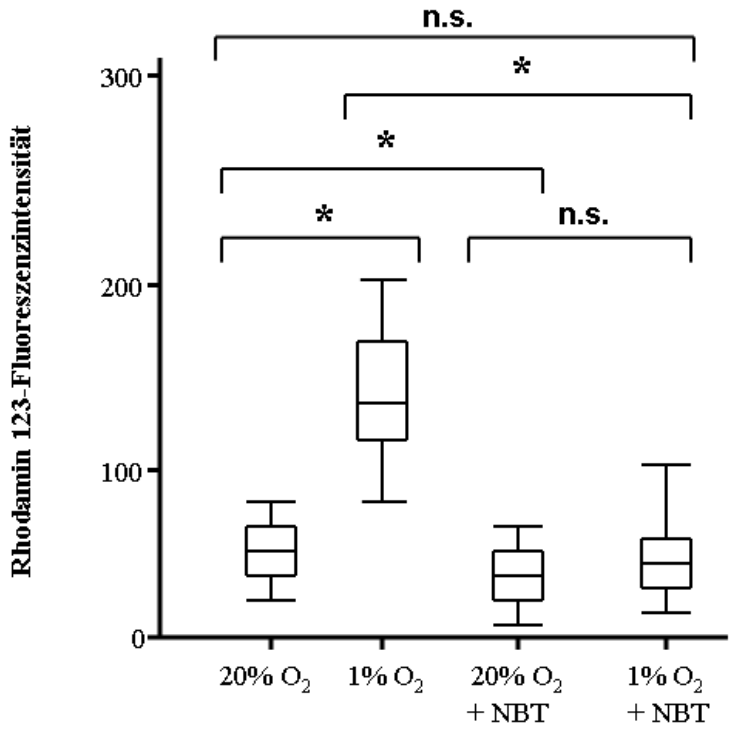

Abb. 31: Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75 der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität eines Versuchstages bei Kontrollzellen und NBT-inkubierten Zellen nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80). * kennzeichnet Unterschiede mit $p<0,05$; n.s. kennzeichnet Unterschiede mit $p>0,05$.

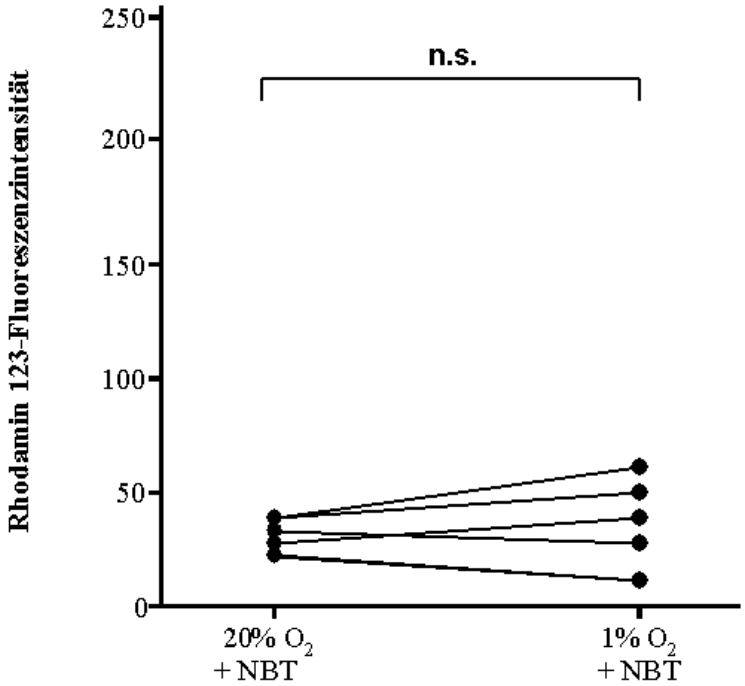

Abb. 32: Grauwert-kodierte intrazelluläre Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) und NBT-Zugabe. Jeder Punkt gibt den ermittelten Medianwert eines Versuchstages wieder. n.s. kennzeichnet Unterschiede mit p>0,05.

20 % O_2	1 % O_2	20 % O_2 + NBT	1 % O_2 + NBT
52	144	29	36
43	106	42	48
39	138	36	32
48	135	40	57
21	135	17	11

Tabelle 9: Medianwerte der Grauwert-kodierten intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach NBT-Zugabe.

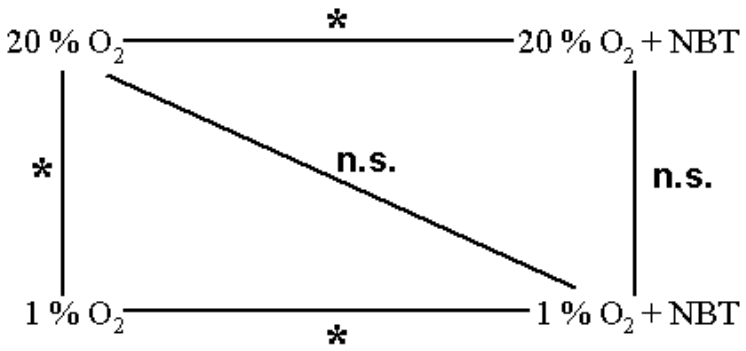

Abb. 33: Statistisch gesicherte Signifikanzen der Unterschiede in der intrazellulären Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität nach einstündiger Normoxie (20 % O_2, n=80) und Hypoxie (1 % O_2, n=80) in Kontrollen und nach NBT-Zugabe. * kennzeichnet Unterschiede mit p<0,05; n.s. kennzeichnet Unterschiede mit p>0,05.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es zu ermitteln, welche ROS unter Hypoxie in PC12-Zellen der Ratte gebildet werden. Ebenfalls wurde die Spezifität des Fluoreszenzindikators H_2R für die ROS-Untersuchung untersucht. Die Fragestellung ergibt sich aus der Tatsache, dass in den bisher durchgeführten Hypoxie-Studien an PC12-Zellen noch keine ROS-Differenzierung vorgenommen wurde.

Für diese Arbeit wurden PC12-Zellen der Ratte benutzt, da sie eine sehr hohe Sensitivität gegenüber O_2-Schwankungen aufweisen. Die PC12-Zellen wurden in Gegenwart des Redox-sensitiven Fluoreszenzindikators H_2R unter Normoxie und Hypoxie inkubiert. H_2R ist in der Lage, die Zellmembran zu penetrieren und signifikante intrazelluläre Konzentrationen zu erreichen. Zudem weist es eine minimale zelluläre Toxizität auf (Royall und Ischiropoulos, 1993). Die Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität in den PC12-Zellen wurde am LSM gemessen.
Bei allen Messungen ohne Inhibitor- oder Radikalfängerzusatz konnte ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass intrazellulär gebildete ROS das farblose H_2R zum fluoreszierenden Rhodamin 123 oxidieren (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). Höhler et al. (1999) sowie Kummer et al. (2003), die in ihren Versuchen ebenfalls die gleiche Zelllinie verwendeten, konnten einen Anstieg der Hypoxie-induzierten Indikatorfluoreszenzintensität zeigen. Die Arbeitsgruppe von Fandrey et al. (1994) verzeichnete in HepG2-Zellen jedoch eine Abnahme der Hypoxie-induzierten Indikatorfluoreszenzintensität, ebenso zeigte die Arbeitsgruppe von Kroll und Czyzyk-Krzeska (1998) in PC12-Zellen eine Abnahme der Hypoxie-induzierten Fluoreszenzintensität. Nach Semenza (2000) hängen jedoch die widersprüchlichen Ergebnisse bei der Fluoreszenzintensitätsmessung mit den Messverfahren zusammen. Kroll und Czyzyk-Krzeska z.B. haben die Messung erst einige Zeit nach der Inkubation durchgeführt, daher könnte ein Hypoxie-bedingter Fluoreszenz-Anstieg auf Grund der Reoxygenierung vor den Messungen wieder abgenommen haben (Sell, 2001).

In allen 35 Experimenten mit PC12-Zellen wurde mit Hilfe des Fluoreszenzindikators H_2R ein signifikanter Hypoxie-abhängiger Fluoreszenzintensitätsanstieg festgestellt. Somit zeigt sich eine Wiederholbarkeit der Messungen mit dem Fluoreszenzindikator H_2R für Versuche in PC12-Zellen unter Hypoxie.

Um die Spezifität des Fluoreszenzindikators H_2R für ROS zu untersuchen, wurden zur genaueren Differenzierung verschiedene Radikalfänger und Inhibitoren der ROS-Bildung eingesetzt.
ROS entstehen als Nebenprodukte in der mitochondrialen Atmungskette und bei anderen Prozessen, bei denen molekularer Sauerstoff metabolisiert wird. $O_2^{\cdot -}$ entstehen durch die Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff. Diese tragen dann zur Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies wie H_2O_2, $OH^{\bullet}$ oder $ONOO^-$ bei. Dabei ist H_2O_2 an sich ein wenig reaktives, ungeladenes Molekül, das Membranbarrieren durchqueren und in den Zellkern diffundieren kann. H_2O_2 reagiert allerdings mit zweiwertigem Eisen in der Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen und dreiwertigem Eisen ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$) (Kamata und Hirata, 1999).

Um herauszufinden, ob extrazelluläres H_2O_2 bei der ROS-Bildung beteiligt ist, wurde KAT eingesetzt. KAT ist ein Enzym, das in fast allen Geweben von Säugetieren vorkommt und besonders in den Peroxisomen der Leber konzentriert ist (Nordberg und Arner, 2001). KAT degradiert H_2O_2 durch Umwandlung zu H_2O und O_2 (Goldhaber et al., 1992). Die Messergebnisse von KAT-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollen wiesen nach Inkubation unter normoxischen und hypoxischen Konditionen keinen signifikanten Unterschied auf. Die gemessenen Werte bei KAT-behandelten Zellen waren im Vergleich zu den Kontrollen tendenziell geringer, jedoch nicht signifikant.
Die in dieser Arbeit gezeigten nicht signifikanten Werte bei KAT-behandelten Zellen zeigen, dass extrazelluläres H_2O_2 H_2R nicht in Rhodamin 123 umwandelt. Eine Erklärung könnte sein, dass KAT nicht ausreichend genug in die Zellen diffundiert und so keine Wirkung zeigt.
Obwohl es durch die Versuche mit KAT in diesem Versuchsaufbau zu keiner H_2R-Umwandlung gekommen ist, konnten jedoch mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass KAT H_2O_2-bedingte Signale reduzieren kann. So konnten Masuda et al. (2007) nachweisen, dass eine H_2O_2-induzierte Detrusormehraktivität der Ratte durch KAT aufgehoben werden kann. De Moreno et al. (2008) konnten durch den Einsatz von KAT die H_2O_2-abhängige Tumorprogredienz stoppen.

Diese Befunde könnten darauf beruhen, dass durch die extrazelluläre Umwandlung von H_2O_2 zu H_2O und O_2 durch die KAT ein vermehrter Übertritt von intrazellulärem H_2O_2 in den Extrazellulärraum provoziert wird und somit auch ein erhöhter intrazellulärer H_2O_2-Verbrauch resultieren kann.

Um die Frage zu klären, ob intrazelluläres H_2O_2 bei der Umwandlung von H_2R in Rhodamin 123 eine Rolle spielt, wurde CYS als intrazellulärer H_2O_2-Fänger (Winterbourn et Metodiewa, 1999) eingesetzt. Die Messergebnisse von CYS-behandelten Zellen und Kontrollen wiesen nach Inkubation unter Normoxie keinen signifikanten Unterschied auf, jedoch konnte unter hypoxischen Bedingungen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Hypoxie-bedingte Fluoreszenzanstieg war in CYS-behandelten Zellen geringer als in Kontrollen.
Miller et al. (1991) z.B. konnten ebenfalls einen positiven Effekt von CYS zeigen, der auf seiner Funktion als Fänger intrazellulär gebildeten H_2O_2 beruht. Durch den Einsatz von CYS konnten die durch H_2O_2 induzierten DNS-Schäden reduziert werden. CYS weist jedoch neben DNS-protektiven auch DNS-schädigende Wirkungen auf (Kanabus-Kaminska et al., 1988).
Der gemessene Effekt im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit ist zwar gering, aber die Ergebnisse deuten darauf hin, dass intrazellulär gebildetes H_2O_2 bei der Konversion von H_2R in Rhodamin 123 mit involviert ist.

PHEN wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob Eisen bei der H_2R-Umwandlung unter Hypoxie eine Rolle spielt. PHEN ist ein Eisenchelator, welcher die Bildung von OH-Radikalen aus H_2O_2 verhindert (Van den Hoek et al., 1997). Im Vergleich zu Kontrollen wiesen PHEN-behandelte Zellen nach Inkubation unter normoxischen und hypoxischen Konditionen keinen signifikanten Unterschied in der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität auf. Die Fluoreszenzintensität der PHEN-behandelten Zellen war tendenziell geringer. Lediglich in einem Versuch wiesen PHEN-behandelte Zellen im Vergleich zu den Kontrollen unter Hypoxie eine signifikant geringere Fluoreszenzintensität auf.
Gille et al. (1992) konnten in Ovarialzellen von Hamstern ebenfalls keinen Effekt von PHEN vorweisen. Die von ihnen gemessenen Hypoxie-induzierten Zellschäden konnten durch den Einsatz von PHEN nicht reduziert werden. Auch Flemmig und Arnhold (2007) konnten in ihren Versuchen die Fenton-Reaktion als Quelle für die ROS ausschließen. Zweier et al. (1994) jedoch zeigten in ihren Versuchen, dass durch Einsatz von

Deferoxamin nach Anoxie und Reoxygenation die Fe^{2+}-abhängige OH-Radikalbildung reduziert werden kann.
Die Tatsache, dass die Messergebnisse in diesem Versuchsaufbau bis auf einen Versuch keine signifikanten Unterschiede zeigen, deutet darauf hin, dass Fe^{2+} über die Fenton-Reaktion nicht zur H_2R-Umwandlung in PC12-Zellen unter Hypoxie beitragen.

Das $OH^{\bullet}$ zählt zu den aggressivsten ROS (Stahl und Sies, 2002). Auf Grund des hohen Reaktionspotentials ist das $OH^{\bullet}$ eines der stärksten Oxidationsmittel und kann mit fast jeder Art von Molekülen reagieren. Als Hauptquelle für die Entstehung von $OH^{\bullet}$ in biologischen Systemen gilt die Fe^{2+}-vermittelte Fenton-Reaktion (Meneghini, 1997).
Ein potent diffusionsfähiger, langlebiger Fänger von Hydroxylradikalen ist DMTU (Fox, 1984). Es ist ebenso in der Lage Wasserstoffperoxid abzufangen (Jackson et al., 1985) und den $[Ca^{2+}]$-Anstieg während der hypoxischen Periode signifikant zu dämpfen (Ziegelstein et al., 1992). Um zu überprüfen, ob Hydroxylradikale für die H_2R-Umwandlung notwendig sind, wurden Versuche mit DMTU durchgeführt. Die Messergebnisse von DMTU-behandelten Zellen und Kontrollen wiesen nach Inkubation unter Normoxie keine signifikanten Unterschiede auf. Auch nach Inkubation unter hypoxischen Konditionen war der Unterschied nicht signifikant.
Paller et al. (1998) konnten aber im Gegensatz hierzu durch den Einsatz von DMTU eine signifikante Abnahme der Ischämie-bedingten Nierenfunktion bei Ratten vorweisen. Wong et al. (1985) wiederum zeigten in ihren Versuchen bei Schafen durch Verwendung von DMTU keine Beteiligung von $OH^{\bullet}$ bei der Entstehung von Lungenfunktionsstörungen.
Die Messergebnisse in diesem Versuchsaufbau zeigen, dass eine Beteiligung von $OH^{\bullet}$ an der H_2R-Umwandlung in PC12-Zellen unter Hypoxie nicht vorliegt. Somit bestätigen diese Resultate, die mit PHEN erzielten Ergebnisse, dass die Fenton-Reaktion ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$) bei der Umwandlung von H_2R in Rhodamin 123 unter Hypoxie nicht beteiligt ist.

$ONOO^-$ entsteht durch die Reaktion von $O_2^{\bullet -}$ mit $NO^{\bullet}$ (Beckmann et al., 1990). In verschiedenen pathologischen Zuständen werden $O_2^{\bullet -}$ und $NO^{\bullet}$ produziert, die daraufhin zu $ONOO^-$ reagieren. $ONOO^-$ konnte in aktivierten Makrophagen (Ischiropoulus et al., 1992), in Endothelzellen (Kooy et al., 1994), bei rheumatoider Arthritis (Kaur et al., 1994) und beim septischen Schock (Wizemann et al., 1994) nachgewiesen werden. Szabo

et al. (1995) konnten in der frühen Phase des endotoxischen Schocks eine Oxidation des H_2R durch $ONOO^-$ nachweisen. Interessanter Weise konnten Gagnon et al. (1998) in ihren Versuchen zeigen, dass $ONOO^-$ H_2R zu Rhodamin 123 oxidiert, während weder $O_2^{\cdot-}$ oder $NO^\bullet$ zu einer H_2R-Oxidation führen. Zusätzlich konnten sie durch den Einsatz von NO-Synthasehemmern die H_2R-Oxidation blocken. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass nur $ONOO^-$ für die Oxidation von H_2R in Frage kommt. Auch Zulueta et al. (1997) konnten $ONOO^-$ als Ursache für die Oxidation von 2',7'-Dichlorfluorescein ausfindig machen. $O_2^{\cdot-}$ und $NO^\bullet$ führten in ihren Versuchen ebenfalls nicht zur Oxidation von 2',7'-Dichlorfluorescein.
Um zu überprüfen, in wie weit $NO^\bullet$ oder $ONOO^-$ in diesem Versuchsaufbau bei der H_2R-Umwandlung eine Rolle spielen, wurden Versuche mit EBS (Antioxidanz, welches an Peroxynitrit bindet) und L-NMMA (NO-Synthasehemmer) durchgeführt.

EBS ist eine fettlösliche, seleno-organische Verbindung, die eine Reihe von pharmakologischen Wirkungen aufweist, wie z.B. antiinflammatorische und anti-oxidative. EBS inhibiert die Lipidperoxidation durch eine Glutathionperoxidase ähnliche Wirkung (Müller et al., 1984; Wendel et al., 1984). Es blockiert auch die NO- und TNF-α-Produktion in Kupfferzellen der Leber (Shimohashi et al., 2000). Ebenfalls bindet es an Peroxynitrit und hemmt somit dessen Wirkung (Müller et al., 1985; Cotgreave et al., 1987). Die Messergebnisse an EBS-behandelten PC12-Zellen und unbehandelten Kontrollzellen wiesen nach Inkubation unter Normoxie und Hypoxie keine signifikanten Unterschiede auf. Somit ist Peroxynitrit im vorliegenden Versuchsaufbau nicht für die H_2R-Oxidation verantwortlich.
L-NMMA wurde als NO-Synthasehemmer eingesetzt. Dwyer et al., (1991), Reif et Mc Creedy (1995) und Arzumanian et al. (2003) konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass L-NMMA alle NOS-Formen inhibiert.
$NO^\bullet$ wird von NO-Synthasen gebildet (Palmer et al., 1988; Marletta et al., 1988). Neben einer endothelialen NO-Synthase (eNOS) sind noch zwei weitere Isoenzyme bekannt: eine induzierbare NOS (iNOS) und eine neuronale NOS (nNOS). Alle drei Isoformen sind Häm-Proteine (Li et Forstermann, 2000). Die eNOS wird vor allem in Gefäßendothelzellen exprimiert (Morris et al., 1994). Die iNOS kann nach Stimulation in einer Vielzahl von Zellen (z.B. in Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, aber auch in Blutzellen) exprimiert werden (Morris et al., 1994; Nathan, 1992). Die nNOS findet sich vor allem in peripheren und zentralen Neuronen (Thippeswamy et Morris, 2002).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten eine Mitbeteiligung von NO• bei Hypoxie-induzierten neurologischen Schäden in der Perinatalperiode zeigen (Cai et al., 1998; Kadhim et al., 2006). So konnte unter Hypoxie im Plexus choroideus eine vermehrte nNOS-Expression festgestellt werden (Lin et al., 1996). Ebenfalls führt Hypoxie zu einer Mehrexpression von iNOS (Melillo et al., 1995). Bolanos et al. (1999) konnten unter Hypoxie eine vermehrte eNOS-Expression zeigen, die zu einer Vasodilatation führte.
In dieser Arbeit wiesen die Messergebnisse von L-NMMA-behandelten Zellen und Kontrollen sowohl nach Inkubation unter Hypoxie als auch unter Normoxie keinen signifikanten Unterschied auf. Somit ist auch NO• nicht für die H_2R-Oxidation in PC12-Zellen unter Normoxie und Hyopoxie verantwortlich.

$O_2^{\cdot-}$ wird durch eine univalente Reduktion aus molekularem Sauerstoff gebildet. Wie zuvor erwähnt, ist diese Reaktion der grundlegende Schritt in der Entstehung von ROS, insofern dass sämtliche reaktiven Zwischenprodukte aus diesem Radikal entstehen können (McIntyre et al., 1999). Ebenfalls assoziiert mit oxidativem Stress, handelt es sich bei $O_2^{\cdot-}$ um eine dafür untypische Spezies, da es sowohl als ein Reduktionsmittel, in dem es sein zusätzliches Elektron auf ein anderes Molekül (z.B. NO) überträgt, als auch als Oxidationsmittel, wobei es zu H_2O_2 reduziert wird, agieren kann (Elstner, 1990). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten eine vermehrte $O_2^{\cdot-}$-Bildung unter Hypoxie nachweisen (Terada et al., 1992; Marshall et al., 1996). Das $O_2^{\cdot-}$ ist in der Lage Plasmamembranen von verschiedenen Zellen zu penetrieren und kann so in den Extrazellulärraum gelangen (Lynch et Fridovich, 1978). Terada (1996) konnte in seinen Versuchen zeigen, dass Zellschäden durch den Übertritt von $O_2^{\cdot-}$ in den Extrazellulärraum vermittelt werden können.
Um herauszufinden, in wie weit intrazelluläres $O_2^{\cdot-}$ bei der H_2R-Oxidation beteiligt ist, wurde NBT eingesetzt. NBT ist ein bekannter intrazellulärer $O_2^{\cdot-}$-Fänger (Rook et al., 1985; Berridge et al., 2005). Es wird durch $O_2^{\cdot-}$ zu Diformazan reduziert, welches einen bläulich-schwarzen Niederschlag bildet und lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann (DiGregorio et al., 1987). Die Messungen mit NBT haben einen ausgeprägten Effekt gezeigt. Die Messergebnisse von NBT-behandelten Zellen wiesen im Vergleich zu Kontrollen nach Inkubation unter Normoxie signifikant geringere Werte auf, der Signalunterschied war jedoch sehr gering. Die Fluoreszenzintensität von NBT-behandelten Zellen war nach Inkubation unter Hypoxie im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls signifikant geringer, hier zeigte sich ein grosser Signalunterschied. Auch wenn

die Fluoreszenzintensität von NBT-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollen unter Normoxie und Hypoxie signifikant geringer war, war immer noch ein geringer Signalanstieg vorhanden. Die Ergebnisse von NBT-behandelten Zellen unter Hypoxie wiesen im Vergleich zu Kontrollen unter Normoxie keine signifikanten Unterschiede auf. Ebenfalls zeigten die Messergebnisse von NBT-behandelten Zellen unter Normoxie im Vergleich zur Hypoxie keine signifikanten Unterschiede (Abb. 31, 33 und Tabelle 9).
Somit konnten diese Ergebnisse eindrucksvoll belegen, dass bei PC12-Zellen unter Hypoxie hauptsächlich das $O_2^{\cdot -}$ für die Umwandlung von H_2R zu Rhodamin 123 verantwortlich ist.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es bei PC12-Zellen unter Hypoxie zu einem signifikanten ROS-Anstieg kommt. Das H_2R eignet sich sehr gut als Fluoreszenzindikator, da bei allen Messungen ohne Inhibitor- oder Radikalfängerzusatz ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden konnte. Schließlich konnte als Hauptbefund dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei PC12-Zellen der Ratte unter Hypoxie hauptsächlich das $O_2^{\cdot -}$ für die Umwandlung von H_2R zu Rhodamin 123 verantwortlich ist. Eine Mitbeteiligung von intrazellulär gebildetem H_2O_2 bei der Hypoxie-induzierten ROS-Bildung konnten die Versuche mit CYS nachweisen. Extrazelluläres H_2O_2, Fe^{2+}-Ionen, $OH^{\bullet}$, $ONOO^-$ sowie $NO^{\bullet}$ konnten als Hypoxie-bedingte Quellen der H_2R-Konversion ausgeschlossen werden.

5. Zusammenfassung

Der O_2-messende Mechanismus chemosensitiver Paraganglien von Säugetieren ist nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. Als Modell für Studien am O_2-messenden Mechanismus Hypoxie-sensitiver Paraganglien dienten PC12-Zellen, da sie eine sehr hohe Sensitivität gegenüber O_2-Schwankungen aufweisen. In Versuchen an PC12-Zellen konnte unter Hypoxie ein intrazellulärer Anstieg von ROS beobachtet werden. In den bisherigen Arbeiten wurde bisher jedoch noch nicht untersucht, welche ROS genau gebildet werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu ermitteln, welche ROS unter Hypoxie in PC12-Zellen der Ratte gebildet werden, ebenfalls wurde die Spezifität des Fluoreszenz-indikators H_2R für die ROS-Untersuchung untersucht. Zur genaueren Differenzierung der ROS wurden verschiedene Radikalfänger und Inhibitoren der ROS-Bildung eingesetzt. Die PC12-Zellen wurden in Gegenwart von H_2R unter Normoxie und Hypoxie inkubiert. Durch intrazellulär gebildete ROS wird die farblose Substanz zu ihrem fluoreszierenden Metaboliten Rhodamin 123 oxidiert. Mittels Laser Scan Mikroskop konnte die Fluoreszenzintensität des Indikators gemessen werden.

In 35 Messungen ohne Inhibitor- oder Radikalfängerzusatz konnte ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden. Um herauszufinden, ob extrazelluläres H_2O_2 bei der H_2R-Oxidation beteiligt ist, wurde Katalase eingesetzt. Die Messergebnisse von mit Katalase-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollen wiesen nach Inkubation unter normoxischen und hypoxischen Konditionen keinen signifikanten Unterschied auf.

Cysteamin wurde als intrazellulärer H_2O_2-Fänger eingesetzt. Die Messergebnisse von Cysteamin-behandelten Zellen und Kontrollen wiesen nach Inkubation unter Normoxie keinen signifikanten Unterschied auf, jedoch konnte unter hypoxischen Bedingungen ein signifikant geringerer Fluoreszenzanstieg in Cysteamin-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollen festgestellt werden.

Phenanthrolin wurde als Eisenchelator eingesetzt. Im Vergleich zu Kontrollen wiesen Phenanthrolin-behandelte Zellen nach Inkubation unter normoxischen und hypoxischen Konditionen keinen signifikanten Unterschied in der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensität auf.

Dimethylharnstoff wurde als Hydroxylradikal-Fänger eingesetzt. Auch die Messergebnisse von Dimethylharnstoff-behandelten Zellen und Kontrollen wiesen nach Inkubation unter Normoxie und Hypoxie keine signifikanten Unterschiede auf.

Um zu überprüfen, in wie weit $NO^{\bullet}$ oder $ONOO^-$ in diesem Versuchsaufbau bei der H_2R-Umwandlung eine Rolle spielen, wurden Versuche mit Ebselen (Antioxidanz, welches an Peroxynitrit bindet) und N-G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA, NO-Synthasehemmer) durchgeführt. Sowohl die Messergebnisse an Ebselen-behandelten PC12-Zellen als auch die an L-NMMA-behandelten Zellen wiesen nach Inkubation unter Normoxie und Hypoxie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf.

Nitroblautetrazolium (NBT) wurde schließlich als intrazellulärer $O_2^{\bullet -}$-Fänger eingesetzt. Die Messergebnisse von NBT-behandelten Zellen wiesen im Vergleich zu Kontrollen nach Inkubation unter Normoxie und Hypoxie signifikant geringere Werte auf. In NBT-behandelten Zellen führte Hypoxie nicht mehr zu einem siginifikanten Anstieg der Indikatorfluoreszenz.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es bei PC12-Zellen unter Hypoxie zu einem signifikanten ROS-Anstieg kommt. Das H_2R eignet sich sehr gut als Fluoreszenzindikator, da bei allen Messungen ohne Inhibitor- oder Radikalfängerzusatz ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden konnte. Schließlich konnte als Hauptbefund dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei PC12-Zellen der Ratte unter Hypoxie hauptsächlich das $O_2^{\bullet -}$ für die Umwandlung von H_2R zu Rhodamin 123 verantwortlich ist. Eine Mitbeteiligung von intrazellulär gebildetem H_2O_2 bei der Hypoxie-induzierten ROS-Bildung konnten die Versuche mit Cysteamin zeigen. Extrazelluläres H_2O_2, Fe^{2+}-Ionen, $OH^{\bullet}$, $ONOO^-$ sowie $NO^{\bullet}$ konnten als Hypoxie-bedingte Quellen der H_2R-Konversion ausgeschlossen werden.

6. Summary

The O_2-sensor mechanism of mammalian chemosensitive paraganglia is still not fully understood. A tumour cell line (PC12-cells) derived from the rat adrenal medulla is highly sensitive to changes in pO_2 and, therefore often utilized to serve as model to investigate this O_2-sensor mechanism. In PC12-cells, an intracellular increase of reactive oxygen species (ROS) has been observed during hypoxia, but it is still unknown, which specific ROS is produced.

The aim of the present study was to investigate which particular ROS are produced during hypoxia in rat PC12-cells. In addition, the specificity of the redox-sensitive indicator dihydrorhodamine 123 (H_2R) for the detection of ROS was investigated. PC12-cells were exposed to H_2R during normoxia and hypoxia. This non-fluorescent dye is oxidized by intracellular ROS to its fluorescent metabolite rhodamine 123. Fluorescence was measured by laser scanning microscopy. Several radical-scavengers and inhibitors of ROS-generation were used for ROS-differentiation.

Catalase was used to determine the involvement of extracellular H_2O_2 in H_2R-oxidation. Cysteamine served as an intracellular H_2O_2-scavenger. 1,10-Phenanthroline was utilized as an iron-metal chelator, which blocks the hydroxyl radical generation. Dimethylthiourea was used as a scavenger of hydroxyl radicals. Ebselen is a scavenger of peroxynitrite. The NOS inhibitor NG-monomethyl-L-arginine acetate (L-NMMA) was used to inhibit NO-production. Nitro blue tetrazolium (NBT) is a scavenger of superoxide anions.

In all 35 experiments without inhibitor or scavenger additives, a significantly increased fluorescence intensity was observed when PC12-cells were exposed to hypoxia. Treatment of PC12-cells with catalse, 1,10-Phenanthroline, dimethylthiourea, ebselen and L-NMMA had no significant impact upon normoxic and hypoxic H_2R-oxidation. The results obtained from PC12-cells after incubation with cysteamine showed slight reduction in the hypoxia-induced increase in fluorescence indicator intensity wheras normoxic fluorescence intensity remained unaffected. In contrast NBT caused a significant reduction in fluorescence intensity during hypoxia and normoxia, and fully prevented a hypoxia-induced increase in fluorescence.

In conclusion, the results of the present investigation show a hypoxia-induced increase of ROS in PC12-cells. H_2R serves as an adequate indicator to monitor this increase. Superoxide is the dominant ROS being responsible for the oxidation of H_2R in PC12-cells under hypoxia, and intracellular H_2O_2 is additionally involved.

7. Literaturverzeichnis

Acker H (1993), Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. Respir Physiol 95: 1-10

Acker H (1994), Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. Respir Physiol 95: 1-10

Acker T & Acker H (2004), Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. J Exp Biol 207: 3171-3188

Acker H, Bölling B, Delpiano MA, Dufau E, Görlach A & Holtermann G (1992), The meaning of H_2O_2 generation in carotid body cells for pO_2 chemoreception. J Auton Nerv Syst 41: 41-51

Acker H und Xue D (1995), Mechanisms of O_2-sensing in the carotid body in comparison with other O_2-sensing cells. News Physiol Sci 10: 211-216

Arzumanian V, Stankevicius E, Laukeviciene A, Kevelaitis E (2003), Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. Medicina (Kaunas) 39: 535-541

Babior BM (1999), Confidentiality. Curr Opin Hematol 6: 1-2

Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH (2003), Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. J Biol Chem 278: 3510-3513

Bass DA, Parce JAW, Dechatelet LR & Thomas M (1983), Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. J Immunol 130: 1910-1917

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Fremman BA (1990), Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 87: 1620-4

Berridge MV, Herst PM and Tan AS (2005), Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev 11: 127–152

Bortz und Lienert (1998), Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung

Boveris A & Chance B (1973), The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J 134: 707-716

Buckler KJ (1997), A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells. J Physiol 498: 649-662

Buckler KJ (1999), Background leak K^+-currents and oxygen sensing in the carotid body type I cells. Respir Physiol 115: 179-187

Burkitt MJ, Wardman P (2001), Cytochrome C is a potent catalyst of dichlorofluorescein oxidation: implications for the role of reactive oxygen species in apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 282: 329-33

Cai Z, Hutchins JB, Rhodes PG (1998), Intrauterine hypoxia-ischemia alters nitric oxide synthase expression and activity in fetal and neonatal rat brains. Brain Res Dev Brain Res 109: 265-9

Capaldi RA (1982), Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. Biochim Biophys Acta 694: 291-306

Capaldi RA, Malatesta & Darley-Usmar VM (1983), Structure of cytochrome c oxidase. Biochim Biophys Acta 726: 135-148

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 (1983), Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. Anal Biochem 134: 111-116

Chance B, Sies H, Boveris A (1979), Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 59: 527-605

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser 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, 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-1 alpha during hypoxia: a mechanism of O_2 sensing. J Biol Chem 275: 25130-8

Chandel NS & Schumacker PT (1999), Cells depleted of mitochondrial DNA (p0) yield insight into physiological mechanisms. FEBS Lett 454: 173-176

Chandel NS & Schumacker PT (2000), Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. J Appl Physiol 88: 1880-1889

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

Cheng G, Lambeth JD (2004), NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. J Biol Chem. 279: 4737-4742

Chen Q, Vazquez J, Moghaddas S, Hoppel CL & Lesnefsky EJ (2003), Production of reactive oxygen species by mitochondria. J Biol Chem 278: 36027-36031

Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (2000), Hypoxia inducible factor-alpha binding and

ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. J Biol Chem 275: 25733-41

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

Conforti L & Millhorn DE (2000), Regulation of Shaker-type potassium channels by hypoxia. Oxygen-sensitive K^+ channels in PC12 cells. Adv Exp Med Biol 475: 265-274

Cotgreave IA, Sandy MS, Berggres M, Modeus P, Smith MT (1987), N-acetyl-cystein and glutathione-dependent protective effects of PZ-51 (ebselen) against diquatinduced cytotoxicity in isolated hepatocytes. Biochem Pharmacol 36: 2899–2904

Cross AR und Jones OTG (1990), Enzymic mechanisms of superoxide production. Biochim Biophys Acta 1057: 281-298

Crow JP (1997), Dichlorodihydrofluorescein and dihyrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. Nitric Oxide 1: 145-157

Czyzyk-Krzeska MF, Bayliss DA, Lawson EE & Millhorn DE (1992), Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia. J Neurochem 58: 1538-1546

Czyzyk-Krzeska MF, Furnari BA, Lawson EE & Millhorn DE (1994), Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. J Biol Chem 269: 760-764

De Groot H, Littauer A (1988), Reoxygenation injury in isolated hepatocytes: cell death precedes conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. Biochem Biophys Res Commun 155: 278-82

DiGregorio KA, Cilento EV, Lantz RC (1987), Measurement of superoxide release from single pulmonary alveolar macrophages. Am J Physiol 252: 677-83

Dikalova A, Clempus R, Lassegue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin A, Lyle A, Weber DS, Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD, Griendling KK (2005), Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. Circulation 112: 2668-2676

Doege K, Heine S, Jensen I, Jelkmann W, Metzen E (2005), Inhibition of mitochondrial respiration elevates oxygen concentration, but leaves regulation of hypoxia-inducible factor (HIF) intact. Blood 106: 2311–7

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, Zuohui S & Schumacker PT (1998), Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. J Biol Chem 273: 11619-11624

Dwyer MA, Bredt DS, Snyder SH (1991), Nitric oxide synthase: irreversible inhibition by L-NG-nitroarginine in brain in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun 176: 1136-1141

Elstner EF (1990), Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin. BI-Wissenschafts-verlag, Mannheim Wien Zürich

Fandrey J, Frede S & Jelkmann W (1994), Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. Biochem 303: 507-510

Fearon IM, Palmer AC, Balmforth AJ, Ball SG Varadi G, Peers C (1999), Modulation of recombinant human cardiac L-type Ca^{2+} channel alpha1C subunits by redox agents and hypoxia. J Physiol 514: 629-637

Finkel T (1998), Oxygen radicals and signalling. Curr Opin Cell Biol 10: 248-253

Flemmig J, Arnhold J (2007), Ferrous ion-induced strand breaks in the DNA plasmid pBR322 are not mediated by hydrogen peroxide. Eur Biophys J 36: 377-84

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

Fox R (1984), Prevention of granulocyte-mediated oxidant lung injury in rats by a hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea. J Clin Invest 74: 1456-1464

Gagnon C, Leblond FA, Filep JG (1998), Peroxynitrite production by human neutrophils, monocytes and lymphocytes challenged with lipopolysaccharide. FEBS Lett 431: 107-10

Geiszt M, Kopp JB, Varnai P und Leto TL (2000), Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. PNAS 97: 8010-8014

Gavazzi G, Banfi B, Deffert C, Fiette L, Schappi M, Herrmann F, Krause KH (2006), Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. FEBS Lett 580: 497-504

Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL (2003), Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. J Biol Chem 278: 20006-20012

Gille JJ, van Berkel CG, Joenje H (1992), Effect of iron chelators on the cytotoxic and genotoxic action of hyperoxia in Chinese hamster ovary cells. Mutat Res 275: 31-9

Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF (1988), Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. Science 242: 1412-1415

Goldhaber JI, Weiss JN (1992), Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities. Hypertension 20: 118–127

Görlach A, Berchner-Pfannschmidt U, Wotzlaw C, Cool RH, Fandrey J, Acker H, Jungermann K & Kietzmann T (2003), Reactive oxygen species modulate HIF-1 mediated PAI-1 expression: involvement of the GTPase Rac1. Thromb Haemost 89: 926-935

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

Greene LA & Tischler AS (1976), Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 73: 2424-2428

Guillemin K and M A Krasnow (1997), The hypoxic response: huffing and HIFing. Cell 89: 9-12

Hatefi Y (1985), The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Ann Rev Biochem 54: 1015-1069

Hawes EM & Watts JA (1993), Xanthine oxidase/dehydrogenase release following ischemia in isolated rat hearts. Am J Cardiovasc Pathol 4: 326-335

Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM (1999), Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. Free Radic Biol Med 27: 146-59

Henderson LM, Chappell JB (1993), Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? Eur J Biochem 217: 973-80

Höhler B, Goldenberg A, Sell A & Kummer W (2000), Mitochondriale Atmungskette und ROS-Produktion in PC12 Zellen. Ann Anat 182: 123

Höhler B, Lange B, Holzapfel B, Goldenberg A, Hänze J, Sell A, Tastan 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 Lett 457: 53-56

Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS (1992), Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. Arch Biochem Biophys 298: 446-51

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin Jr WG (2001), HIF-1alpha 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-1alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O_2-regulated prolyl hydroxylation. Science 292: 468-472

Jackson JH, White CW, Parker NB, Ryan JW, Repine JE (1985), Dimethylthiourea consumption reflects H_20_2 concentrations and severity of acute lung injury. J AppZ Physiol 59: 1995-1998

Jones SA, O`Donnel VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ & Jones OTG (1996), Expression of phagozyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. Am J Physiol 271: H1626-1634

Kadhim H, Khalifa M, Deltenre P, Casimir G, Sébire G (2006), Molecular mechanisms of cell death in periventricular leukomalacia. Neurology 67: 293-9

Kamata H, Hirata H (1999), Redox regulation of cellular signalling. Cell Signal Review 11: 1-14

Kanabus-Kaminska JM, Feeley M, Birnboim HC (1988), Simultaneous protective and damaging effects of cysteamine on intracellular DNA of leukocytes. Free Radic Biol Med 4: 141-5

Karnovsky MJ (1994), Cytochemistry and reactive oxygen species: a retrospective. Biochem 102: 15-27

Kaur H, Halliwell B (1994), Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. FEBS Lett 350: 9-12

Kim W and W G Kaelin Jr (2003), The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. Curr Opin Genet Dev 13: 55-60

Kooy NW, Royall JA (1994), Agonist-induced peroxynitrite production from endothelial cells. Arch Biochem Biophys 310: 352-9

Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1994), Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radic Biol Med 16: 149-56

Kroll SL & Czyzyk-Krzeska MF (1998), Role of H_20_2 and heme-containing O_2 sensors in hypoxic regulation of tyrosine hydroxylase gene expression. Am J Phsiol 274: C167-C174

Kumar GK, Overholt JL, Bright GR, Hui KY, Lu H, Gratzl M & Prabhakar NR (1998), Release of dopamine and norephidrine by hypoxia from PC-12 cells. Am J Physiol 274: C1592-1600

Kummer W (1996) in: Autonomic-endocrine interactions. (Unsicker K, Ed.) Harwood Academic Publisher Chur: 315-356

Kummer W & Acker H (1995), Immunhistochemical 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 flourescent cells of sympathetic ganglia. Histochem Cell Biol 107: 151-158

Lagercrantz H (1996), Stress, arousal, and gene activation at birth. News Physiol Sci 11: 214-218

Lawrence A, Jones CM, Wardman P, Burkitt MJ (2003), Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescin by cytochrome c/H_20_2. Implications for oxidative stress during apoptosis. J Biol Chem 278: 29410-9

Le Bel CP, Ischiropoulos H & Bondy SC (1992), Evaluation of the probe 2´7´-dichloro-fluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol 5: 227-231

Leniger-Follert E, D W Lubbers (1975), Regulation of local tissue pO_2 of the brain cortex at different arterial O_2 pressures. Pflugers Arch 359: 81-95

Li H, Förstermann U (2000), Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. J Pathol 190: 244-54 Review

Lin AY, Szmydynger-Chodobska J, Rahman MP, Mayer B, Monfils PR, Johanson CE, Lim YP, Corsetti S, Chodobski A (1996), Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in rat anterior choroidal artery, stromal blood microvessels, and choroid plexus epithelial cells. Cell Tissue Res 285: 411-8

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: G1015-G1020

Lopez-Barneo J (1996), Oxygen-sensing by ion channels and the regulation of cellular functions. Trends Neurosci 19: 435-440

Lopez-Barneo J, Lopez-Lopez JR, Urena J & Gonzalez C (1988), Chemotransduction in the carotid body: K^+-current modulated by pO_2 in type I chemoreceptor cells. Science 241: 580-582

López-Barneo J, Ortega-Sáenz P, Molina A, Franco-Obregón A, Ureña J & Castellano A (1997), Ion channels and heme proteins as oxygen sensors. Oxygen sensing by ion channels. Kidney Int 51: 454-461

Lloreta-Trull J & Serrano S (1998), Biology and pathology of the mitochondrion. Ultrastruct Pathol 2: 357-367

Lynch RE, Fridovich I (1978), Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. J Biol Chem 253: 4697-9

Maranchie J K and Zhan Y (2005), Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2-alpha transcriptional activity in von Hippel-Lindau-deficient renal cell carcinoma. Cancer Res 65: 9190-3

Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS (1988), Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry 27: 8706-11

Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE (1996), Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. Am J Respir Cell Mol Biol 15: 633-44

Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H, Yabe-Nishimura C (2005), Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. Circulation 112: 2677-2685

Maxwell P, Weisner M, Chang GW, Clifford S, Vaux E, Pugh C, Maher E & Ratcliffe P (1999), The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 399: 271-275

McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF (1999), Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. Hypertension 34: 539-545

Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L (1995), A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. J Exp Med 182: 1683-93

Meneghini R (1997), Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. Free Radic Biol Med 23: 783-92 Review

Miller DL, Thomas RM, Frazier ME (1991), Ultrasonic cavitation indirectly induces single strand breaks in DNA of viable cells in vitro by the action of residual hydrogen peroxide. Ultrasound Med Biol: 17: 729-35

Morris SM Jr, Billiar TR (1994), New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. Am J Physiol 266: 829-39

Müller A, Cadenas E, Graf P, Sies H (1984), A novel biologically active selenoorganic compound, I: glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ51 (ebselen). Biochem Pharmacol 33: 3235–3239

Müller A, Gabriel H, Sies S (1985), A novel biologically active seleno-organic compound—IV. Biochem Pharmacol 34: 1185–1189

Nathan C (1992), Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J 6: 3051-64 Review

Nordberg J und Arner E (2001), Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 31: 1287-1312

Paddenberg R, Goldenberg A, Faulhammer P, Braun-Dullaeus RC & Kummer W (2003b), Mitochondrial complex II is essential for hypoxia-induced ROS generation and vasoconstriction in the pulmonary vasculature. Adv Exp Med Biol 536: 163-169

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

Paller MS, Schnaith EJ, Rosenberg ME (1998), Purinergic receptors mediate cell proliferation and enhanced recovery from renal ischemia by adenosine triphosphate. J Lab Clin Med 131: 174-83

Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S (1988), L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. Biochem Biophys Res Commun 153: 1251-6

Papa S und Skulachev VP (1997), Reactive oyxgen species, mitochondria apoptosis and aging. Mol cell biochem 174: 305-319

Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G & Wolf G (1997), 2´7´-Dihydro-chlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. FEBS Lett 416: 175-178

Reif DW, Mc Creedy SA (1995), N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-Larginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. Arch Biochem Biophys 320: 170-176

Rhee SG (1999), Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. Exp Mol Med 31: 53-59

Rodney E, Shackelford William, Kaufmann K und Ricard S Paules (2000), Oxidative Stress and cell cycle checkpoint function. Free Radical Biology & Medicine 28: 1387-1404

Rook GA, Steele J, Umar S, Dockrell HM (1985), A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon. J Immunol Methods 82: 161–7

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 Ischiropuolos (1993), Evaluation of 2´,7´-dichlorofluorescin and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H_2O_2 in cultured endothel cells. Arch Biochem Biophys 302: 348-355

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

Sell A (2001), Differenzierung mitochondrialer und nicht-mitochondrialer Quellen von reaktiven Sauerstoffspezies in PC12-Zellen unter Hypoxie. Thesis: Justus-Liebig-Universität

Semenza GL (1999), Perspectives on oxygen sensing. Cell 98: 281-284

Semenza GL (2000a), HIF-1 and human disease: one highly involved factor. Genes & Development 14: 1983-1991

Semenza GL (2000b), Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. Respir Res 1: 159-162

Sharp RE & Chapman SK (1999), Mechanisms for regulating electron transfer in multi-centre redox proteins. Biochim Biophys Acta 1432: 143-158

Shimohashi N, Nakamuta M, Uchimura K, Sugimoto R, Iwamoto H, Enjoji M, Nawata H (2000), Selenoorganic Compound, Ebselen, Inhibits Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor-a Production by the Modulation of Jun-N-terminal Kinase and the NF-kB Signaling Pathway in Rat Kupffer Cells. J Cell Biochem 78: 595-606

Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA, Crapo JD (1986), Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. Lab Invest 55: 363-371

Spicer Z & Millhorn DE (2003), Oxygen sensing in neuroendocrine cells and other cell types: Pheochomocytoma (PC12) cells as an experimental model. Endocrine Pathol 14: 277-292

Srinivas V, Zhu X, Salceda S, Nakamura R, Caro J. (1999), Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) is a nonheme iron protein. Implications for oxygen sensing. J Biol Chem 274: 1180

Stahl W und Sies H (2002), Introduction: Reactive Oxygen Species. Institut für Stahl Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf

Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H (1995), Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. FEBS Lett 372: 229-32

Thannickal VJ, und Fanburg BL (2000), Reactive oxygen species in cell signalling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279: L1005-L1028

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 278: 25234-25246

Täpper K (2005), Rolle der Succinatdehydrogenase im Hypoxie-induzierten Anstieg der Tyrosinhydroxylase- und Adrenomedullin-mRNA sowie in der Hypoxie-induzierten mitochondrialen ROS-Bildung in PC12-Zellen. Thesis: Justus-Liebig-Universität

Taylor und Peers 1998, Hypoxia evokes catecholamine secretion from rat pheochromocytoma PC-12 cells. Biochem Biophys Res Commun 248: 13-7

Terada LS (1996), Hypoxia-reoxygenation increases O_2-efflux which injures endothelial cells by an extracellular mechanism. Am J Physiol 270: 945-50

Terada LS, Guidot DM, Leff JA, Willingham IR, Hanley ME, Piermattei D, Repine JE (1992), Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. Proc Natl Acad Sci USA 89: 3362-6

Thannickal VJ, und Fanburg BL(2000), Reactive oxygen species in cell signalling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279: L1005-L1028

Thippeswamy T, Morris R (2002), The roles of nitric oxide in dorsal root ganglion neurons. Ann N Y Acad Sci 962: 103-10 Review

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

Turrens JF & Boveris A (1980), Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem J 191: 421-427

Ullrich V und Bachschmid M (2000), Superoxide as a messenger of endothelial function. Biochem Biophys Res Com 278: 1-8

Vanden Hoek TL, Shao Z, Li C, Schumacker PT, Becker LB (1997), Mitochondrial electron transport can become a significant source of oxidative injury in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 29: 2441–2450

Wendel A, Fausel M, Safayhi H, Tiegs G, Otter R (1984), A novel biologically active seleno-organic compound, II: activity of PZ51 in relation to glutathione peroxidase. Biochem Pharmacol 33: 3241–3245

Wenger RH (2005), Mitochondria: oxygen sinks rather than sensors? Med. Hypotheses 66: 380-3

Winston GW, Moore MN, Kirchin MA, Soverchia C (1996), Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, Mytilus edulis: lysosomal

localization and effect of xenobiotics. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 113: 221-9

Winterbourn CC, Metodiewa CD (1999), Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. Free Radic Biol Med 27: 322–328

Wizemann TM, Gardner CR, Laskin JD, Quinones S, Durham SK, Goller NL, Ohnishi ST, Laskin DL (1994), Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. J Leukoc Biol 56: 759-68

Wolin MS, Ahmad M, Gupte SA (2005), Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289: L159-73

Wong C, Fox R, Demling RH (1985), Effect of hydroxyl radical scavenging on endotoxin-induced lung injury. Surgery 97: 300-7

Youngson C, Nurse C, Yeger H, Curnutte JT, Vollmer C, Wong V, Cutz E (1997), Immunocytochemical localization on O_2-sensing protein (NADPH oxidase) in chemoreceptor cells. Microsc Res Tech 37: 101-106

Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS (2001), HIF-1alpha 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 O_2-sensitive K^+ current. Am J Physiol 271: C658-665

Ziegelstein RC, Zweier JL, Mellits ED, Younes A, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS (1992), Dimethylthiourea, an oxygen radical scavenger, protects isolated cardiac myocytes from hypoxic injury by inhibition of $Na(^+)$-Ca^{2+} exchange and not by its antioxidant effects. Circ Res 70: 804-11

Zulueta JJ, Feng-Sheng Y, Hertig IA, Thannickal VJ & Hassoun PM (1995), Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane. Am J Respir Cell Mol Biol 12: 41-49

Zulueta JJ, Sawhney R, Yu FS, Cote CC, Hassoun PM (1997), Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. Am J Physiol 272: 897-902

Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Lutty GA (1994), Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. J Biol Chem 269: 24156-62

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.
Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Kummer für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.
Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Brigitte Höhler für die gute Betreuung bei der praktischen Durchführung und dem Schreiben dieser Arbeit sowie Frau Anna Goldenberg für ihre ständige Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Meiner Frau Mürüvvet gebührt der größte Dank, weil sie sehr geduldig war und mich auch bei dieser zweiten Dissertation unterstützt hat.
Ich möchte meinen Eltern Safiye und Hasan Tastan, meinen Geschwistern Hülya und Ilhan sowie meinem Schwager Selim für ihre moralischen Unterstützungen danken.
Danken möchte ich ebenfalls Michael Büttner aus Bern, der sich die Mühe gemacht hat, diese Dissertation zur Korrektur durchzulesen.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Tastan
Vorname:	Hakan
Geburtsdatum:	31.08.1975
Geburtsort:	Flensburg
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

Grundschule:	Grundschule Ramsharde Flensburg	1982-1986
Gymnasium:	Altes Gymnasium Flensburg	1986-1995

Studiengänge

Justus-Liebig-Universität Gießen:	
1. Humanmedizin	10/1995–05/2002
2. Zahnmedizin	04/2002–10/2005
Staatsexamina:	
1. Staatsexamen (Humanmedizin)	03/1999
2. Staatsexamen (Humanmedizin)	03/2001
3. Staatsexamen (Humanmedizin)	05/2002
Staatsexamen (Zahnmedizin)	10/2005

Wissenschaftliche Tätigkeiten

Experimentelle Doktorarbeiten:	1. Institut für Anatomie Gießen	03/1999-03/2001
	2. Institut für Physiologie Gießen	04/2004-05/2005

Veröffentlichungen

„Hypoxic upregulation of tyrosine hydroxylase gene expression is paralleled, but not induced, by increased generation of reactive oxygen species in PC12 cells."
Höhler B, Lange B, Holzapfel B, Goldenberg A, Hänze J, Sell A, Tastan H, Möller W, Kummer W
FEBS Lett 1999 Aug 20; 457 (1): 53-6

„Contractile performance of adult ventricular rat cardiomyocytes is not directly jeopardized by NO/cGMP-dependent induction of pro-apoptotic pathways."
Tastan H, Abdallah Y, Euler G, Piper HM, Schlüter KD
J Mol Cell Cardiol 2007 Feb; 42 (2): 411-21

Promotionen

Promotion zum „Dr. med." am 14.12.2006 mit dem Thema: „Einfluß von NO/cGMP-abhängiger Induktion des pro-apoptotischen Signaltransduktionsweges auf das Kontraktionsverhalten ventrikulärer Herzmuskelzellen."
Note: magna cum laude

Aktuelle Tätigkeit

Seit 01.01.2006 Assistenzarzt am Universitätsklinikum Bern/CH in der Abteilung für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie